

環境ストレスに対する植物の生体応答の柔軟性

久保田茜^{1, 2}, 山口暢俊¹

¹奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス領域
〒630-0192 奈良県生駒市高山町 8916-5

²科学技術振興機構・PREST
〒102-0076 東京都千代田区五番町 7

Plasticity of plant stress responses: mechanisms and ecological implication

Akane Kubota^{1, 2}, Nobutoshi Yamaguchi¹

¹Graduate School of Biological Sciences, Nara Institute of Science and Technology
Takayama 8916-5, Ikoma, Nara, 630-0192, Japan

²JST・PREST, Goban-cho 7, Chiyoda-ku, Tokyo, 102-0076, Japan

DOI: 10.24481/bsj-review.16c1.00285

固着生活を営む植物は、変動する環境にさらされている。環境変動には、日内の温度周期や光周期といった短期的変動から、数か月にわたる季節の移り変わり、さらには気候変動という長期的なスケールに至るまで、極めて幅広い時間軸で植物を取り巻くシグナルが存在する。こうした環境因子に対し、植物は多様な適応機構を発達させることで、自らの生存戦略を成功させると共に、複雑な生態系を築き上げてきた。

近年の大気中 CO₂ 濃度の急激な上昇とそれに伴う気候変動は、開花や展葉、落葉などの植物の季節的活動（フェノロジー）に影響をもたらしている。植物のフェノロジー変化は、植物を餌とする昆虫の生命活動を筆頭に、生態系全体を大きく変えてしまう。一方で植物は、この気候変動に対し、受動的にふるまうだけではなく、炭素や水の循環を通じて地球環境に能動的にも働きかける。こうした植物と気候の双方向的な関係を明らかにし、植物や生態系の動的なバランスを理解するために、モデル植物を駆使した分子生物学的アプローチだけでなく、フィールド環境で生育する他種多様な植物に焦点を当てた分子生態学的なアプローチの重要性はますます高まっていると言えよう。

本稿では、学術変革領域研究「植物気候フィードバック」の掲げる研究目的と歩調を合わせ、変動環境下で植物が示す多様な適応戦略の最前線に迫る 6 編の総説を紹介する。これらの総説は、草本植物から木本植物を含む多種多様な植物種を対象に、環境シグナルを読み解く分子機構から、過酷な環境を生き抜く個体の生理・生活史戦略、そして生物間相互作用に至るまで、多角的な視点から植物のしたたかさを提示するものである。

環境シグナルを「情報」として正確に読み解く能力は、植物の生存にとって不可欠である。久保田氏の総説は、従来の研究で無視されがちであった「温度変動」に着目し、日中の高温と夜間の低温からなる温度周期（thermoperiod）が花成時期を調節する機構を解説する。これ

は、後述するウキクサの休眠芽形成とならび、植物が概日時計を利用することで環境変動を予測することの好例である。

さらに、植物は環境変化への応答を一時的なものにとどめず、「記憶」として保持することがある。山口氏らの総説は、この環境応答の記憶に関わる分子基盤として、エピジェネティクス機構に焦点を当て、とくに抑制性ヒストン修飾 H3K27me3 を除去する JMJ 脱メチル化酵素の役割を概説している。JMJ タンパク質は、高温ストレスなどの環境刺激や発生段階の変化に応じて、特定の遺伝子から H3K27me3 を取り除くことで、その遺伝子の抑制状態を解除し、発現をオンに切り替える。このようなエピゲノムを介した遺伝子発現のスイッチは、HSFA2 を介した H3K4me3 とならんで、植物の環境応答の可塑性の基盤の 1 つとして大きな役割を果たす例だと言えよう (Lämke et al. 2016; Yamaguchi et al. 2021)。

上記のような比較的温和な環境変動とは別に、生存を脅かすほどの極限的な環境に対し、植物は「耐性・回復」と「回避」という対照的な戦略を展開する。種子田氏の総説は、亜高山帯に優占する常緑針葉樹シラビソが発揮する越冬戦略に焦点を当てたものである (Ogasa et al. 2019; Maruta et al. 2022; Taneda et al. 2021, 2022)。冬の亜高山帯では、土壤凍結による水分の供給停止と、強風や低湿度による蒸散が同時に起こる乾燥ストレスが最大の脅威であり、木部仮道管に気泡が生じ水を運べなくなる「エンボリズム」が発生する。本稿では、針葉樹がこの深刻な通水障害に対し、壁孔の閉鎖や、春以降の積極的な「水の再充填」といったメカニズムによって耐え、回復していく過程が、cryo-SEM などの最新技術を用いて鮮やかに描き出されている。

一方で、水生植物であるウキクサは異なる戦略をとる。伊藤氏の総説で解説されるように、ウキクサは、冬の低温や栄養欠乏といった不適環境に遭遇すると、増殖を停止し、デンプンを蓄積した休眠芽 (turion) を形成する (Acosta et al. 2021)。この休眠芽は水底に沈んで越冬し、環境が好転するまで活動を回避することで、過酷な季節を乗り越える。こうした環境に応答した生存戦略は種によって大きく異なっており、適応形質的な側面が垣間見えることも興味深い (Muranaka et al. 2022)。

植物を取り巻く環境の動態は、光・温度といった非生物的な因子だけでなく、他の生物との相互作用によっても決定される。上村氏の総説は、植物と植食性害虫との相互作用において、分子レベルでどのような攻防が行われているかを解説している (Uemura et al. 2020)。植物は害虫の唾液中に含まれるエリシターと呼ばれる成分を認識して防御応答を誘導し、害虫はその防御を弱めるエフェクターを分泌することで対抗する (Arimura et al. 2009)。「食う喰われる」のせめぎあいの多様性は、生態系の動的平衡を体現した典型例であり、今後非モデル生物を含めた研究の発展が期待される。

このような生物間相互作用が、季節という時間軸の中でどのように変化するかを示しているのが、本庄氏の総説である。長期間の野外調査から明らかになってきた多年生のハクサンハタザオとカブモザイクウイルス (TuMV) との関係について詳細に記述されている (Honjo et al. 2020, 2025)。冬の低温期にはウイルスの増殖が強く抑制され、宿主植物は一時的に回復

した状態になる。このように、ウイルスと宿主の関係は一年を通して一定ではなく、季節的な環境変動の中で変化しながら、結果として両者が長期的に共存しうるバランスが形づくられていることが示唆される。

本特集で集められた 6 つの総説は、植物が環境変動に対して「分子機構の精緻化」「生理的な耐久性」「生活史の柔軟な切り替え」「生物間相互作用の動的制御」という多様な戦略を駆使していることを鮮やかに描き出すものである。本特集が、この分野の研究を進めようとする読者の方々にとって、現状を把握し次の一步を考えるうえでの参考となれば幸いである。

引用文献

- Acosta K, Appenroth KJ, Borisjuk L, Edelman M, Heinig U, Jansen MAK, Oyama T, Pasaribu B, Schubert I, Sorrels S et al. (2021) Return of the Lemnaceae: duckweed as a model plant system in the genomics and postgenomics era. *Plant Cell* 33: 3207-34. doi: 10.1093/plcell/koab189
- Arimura G, Matsui K, Takabayashi J. (2009) Chemical and molecular ecology of herbivore-induced plant volatiles: Proximate factors and their ultimate functions. *Plant Cell Physiol.* 50: 911-23.
- Honjo MN, Emura N, Kawagoe T, Sugisaka J, Kamitani M, Nagano AJ, Kudoh H. (2020) Seasonality of interactions between a plant virus and its host during persistent infection in a natural environment. *ISME J* 14: 506–518 doi: 10.1038/s41396-019-0519-4
- Honjo MN, Emura N, Kamitani M, Kudoh H. (2025) Cold suppresses virus accumulation and alters the host transcriptomic response in the turnip mosaic virus–*Arabidopsis halleri* system. *Plant Cell Physiol.* 66: 596–615 doi: 10.1093/pcp/pcaf010
- Lämke J, Brzezinka K, Altmann S, Bäurle I. (2016) A hit-and-run heat shock factor governs sustained histone methylation and transcriptional stress memory. *EMBO J.* 35: 162-75.
- Maruta E, Yazaki K, Ogasa MY, Taneda H. (2022) Pit aspiration causes an apparent loss of xylem hydraulic conductivity in a subalpine fir (*Abies mariesii* Mast.) overwintering at the alpine timberline. *Tree Physiol.* 42: 1228-1238. doi: 10.1093/treephys/tpab173
- Muranaka T, Ito S, Kudoh H, Oyama T. (2022) Circadian-period variation underlies the local adaptation of photoperiodism in the short-day plant *Lemna aequinoctialis*. *iScience* 25:104634. doi: 10.1016/j.isci.2022.104634
- Ogasa MY, Taneda H, Oueda H, Ohtsuka A, Maruta E, David W. (2019) Repair of severe winter xylem embolism supports summer water transport and carbon gain in flagged crowns of the subalpine conifer *Abies veitchii*. *Tree Physiol.* 39: 1725–1735. doi: 10.1093/treephys/tpz066
- Taneda H, Yazaki K, Hiramatsu T, Shimizu B, Sugiura D, Miyazawa Y. (2021) A simple method to observe water distribution in tracheid-bearing wood of subalpine conifer. *Trees* 35: 697–707. doi: 10.1007/s00468-020-02070-y
- Taneda H, Ogasa MY, Yazaki K, Funayama-Noguchi S, Miyazawa Y, Mayr S, Maruta E. (2022) Impact of freeze–thaw-induced pit aspiration on stem water transport in the subalpine conifer *Abies veitchii*. *Plant Physiol.* 190: 1687–1698. doi.org/10.1093/plphys/kiac388

- Uemura T, Hachisu M, Desaki Y, Ito A, Hoshino R, Sano Y, Nozawa A, Mujiono K, Galis I, Yoshida A et al. (2020) Soy and Arabidopsis receptor-like kinases respond to polysaccharide signals from *Spodoptera* species and mediate herbivore resistance. *Commun. Biol.* 3: 224. doi: 10.1038/s42003-020-0959-4
- Wang F, Han T, Jeffrey, Chen Z. (2024) Circadian and photoperiodic regulation of the vegetative to reproductive transition in plants. *Commun. Biol.* 7: 579. doi.org/10.1038/s42003-024-06275-6
- Yamaguchi N, Matsubara S, Yoshimizu K, Seki M, Hamada K, Kamitani M, Kurita Y, Nomura Y, Nagashima K, Inagaki S et al. (2021) H3K27me3 demethylases alter *HSP22* and *HSP17.6C* expression in response to recurring heat in *Arabidopsis*. *Nature Commun.* 12 (1): 3480. doi.org/10.1038/s41467-021-23766-w

温度変動環境下におけるシロイヌナズナの花成制御機構

久保田 茜^{1, 2}

¹奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス領域 植物生理学研究室
〒630-0192 奈良県生駒市高山町 8916-5

²科学技術振興機構・PREST
〒102-0076 東京都千代田区五番町 7

Effect of temperature fluctuation on flowering regulation in *Arabidopsis*

Akane Kubota^{1, 2}

¹Graduate School of Biological Sciences, Nara Institute of Science and Technology
Takayama 8916-5, Ikoma, Nara, 630-0192, Japan

²JST・PREST, Goban-cho 7, Chiyoda-ku, Tokyo, 102-0076, Japan

Keywords: Ambient temperature, BBX transcription factor, Flowering, Thermoperiodism

DOI: 10.24482/bsj-review.16c2.00286

1. はじめに

植物の発生過程において、栄養成長から生殖成長への移行（花成）は、バイオマスに直結する重要なイベントである。最適な開花期を逃してしまうと、送粉者の活動時期と同調できなくなり受粉の成功率も低下する他、結実過程や次世代の種子の発芽率にも影響が及ぶ (Marten-Rodriguez et al. 2025)。従って花成時期の最適化は、種の存続基盤であると同時に、農業生産においても収量や品質を決定づける最重要形質の一つであり、古くから主要な育種対象とされてきた。

花成時期を左右する環境因子のうち、光周期（日長・光質）と温度は、季節を反映する二大環境シグナルである。これらのシグナルは独立して作用するのではなく、複雑な分子ネットワークを介して相互作用する。これまで、実験室環境、すなわち恒温かつ特定の光質・光量条件下で花成制御に関する研究が進められてきた結果、主要な制御因子が単離され、分子経路の大枠は解明された。しかし、自然界の植物は常に変動する環境に晒されており、特に日内温度変動は、単なる日平均温度以上に花成時期に影響を与えることが知られている (Burghardt et al. 2016; Jenkitkonchai et al. 2021; Karsai et al. 2008; Thingnaes et al. 2003; Wendell et al. 2017; Yin et al. 1996)。したがって、恒常環境下で得られた知見だけでは野外で植物が示す複雑な応答を完全には理解できない、という認識が広まりつつある。

本総説では、シロイヌナズナの花成制御について、特に「変動温度環境」という側面に焦点を当てて概説する。まずシロイヌナズナ花成制御の基本的な枠組みを概観するとともに、非ストレス性の低温環境下での花成遅延機構について紹介する。その上で、自然環境下でのフロリゲン遺伝子 *FLOWERING LOCUST* (*FT*) の二峰性発現 (Song et al. 2018) を起点とし、変動温度下で機能する時刻特異的な制御、特に我々が見出した BBX29-CO リプレッサー複合体の役割 (Kubota et al. 2025, preprint) について詳述する。最後に、これらの知見を数理モデルの観点からも考察する

ことで、植物が利用する季節シグナルとしての光周性だけでなく、「温度周期性」による花成制御の精緻なメカニズムについて、読者の皆様の理解が深まれば幸いである。

2. CO-FT モジュールによる花成制御の分子的基盤

シロイヌナズナの花成は、光周性、春化、温度、ジベレリン、齢といった複数の経路によって制御されており、これらのシグナルは最終的に *FT* 遺伝子の発現制御に統合される (Andrés and Coupland 2012; Golembeski and Imaizumi 2015; Jin and Ahn 2021; Takagi et al. 2023)。 *FT* の発現を直接活性化する転写因子が CONSTANS (CO) であり、この *CO-FT* モジュールが光周性花成の中核を担っている (図 1A)。CO の機能は、転写レベルおよび翻訳後レベルで厳密に制御されており、その詳細は優れた多くの総説を参照されたい (Romero et al. 2024; Yu et al. 2025)。

本総説の主題である温度応答との関連で特に重要なのが、CO タンパク質の安定性制御であ

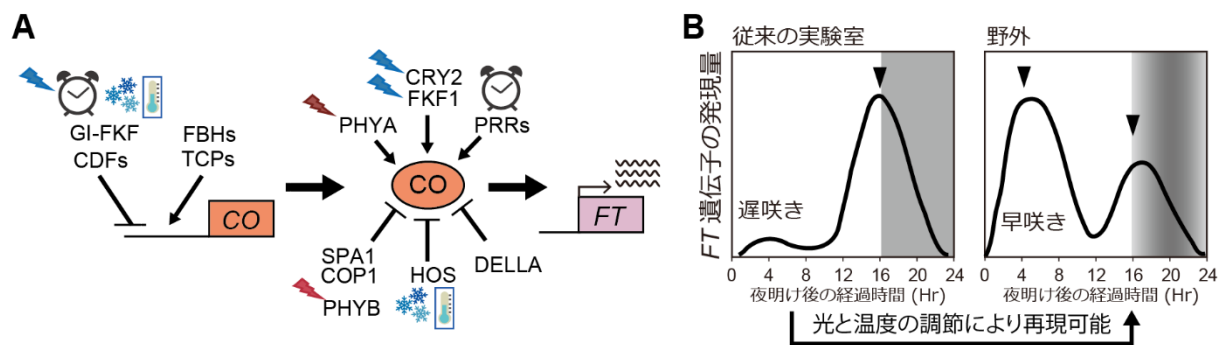


図 1. シロイヌナズナの花成制御機構

- A. 様々な環境因子を介した CO の転写翻訳制御の概略図。光・温度・概日時計・ジベレリンの下流に位置する様々な因子が CO の転写およびタンパク質蓄積量の日内変動を制御する。
B. 実験室環境 (22°C 一定) と野外 (16~22°C 変動) の長日条件における *FT* 遺伝子の発現様式と花成応答。野外では *FT* の発現が朝夕 2 回起こるとともに早咲き傾向を示す。

る。日長認識の核心は、CO タンパク質が長日の夕方という特定の時間帯にのみ蓄積できる点にある。CO タンパク質は、夜間や暗所では E3 ユビキチンリガーゼである COP1-SPA 複合体によって速やかに分解される (Jang et al. 2008; Sarid-Krebs et al. 2015)。また、朝方や日中の赤色光下では、別の E3 リガーゼである HIGH EXPRESSION OF OSMOTICALLY RESPONSIVE GENE 1 (HOS1) が赤色光受容体フィトクロム B (PHYB) と協調して CO の分解を促進する (Jung et al. 2012; Lazaro et al. 2012)。HOS1 は後述するように低温応答にも関与する因子である (Lee et al. 2012)。長日条件の夕方に光を受容すると青色光受容体 CRYPTOCHROME2 (CRY2) や FLAVIN BINDING KELCH F-BOX1 (FKF1)、時計遺伝子 PSEUDORESPONSE REGULATOR がタンパク質間相互作用を介して CO タンパク質を安定化し、*FT* の誘導が日没にかけて最大化する (Hayama et al. 2017; Liu et al. 2008; Song et al. 2012; Zuo et al. 2011)。

CO はさらに、NUCLEAR FACTOR Y (NF-Y) 複合体や他の BBX ファミリータンパク質、DELLA タンパク質など、多数の因子と相互作用するシグナル統合ハブとして機能し、最終的には転写活性・抑制のシグナルのバランスに応じて *FT* 発現の出力が調節される (Ben-Naim et al. 2006; Graeff et al. 2016; Kumimoto et al. 2010; Liu et al. 2020; Wang et al. 2014; Wang et al. 2016)。

実験室で一般的に用いられる恒温・長日条件下では、*FT* 遺伝子は日没時に単一の発現ピークを示す一方、野外の長日条件では、*FT* は朝と夕方の 2 つの時間帯に発現ピークをもつ、二峰性

の発現様式を示す (Song et al. 2018, 図 1B)。FT のダブルピークは、実験室の長日条件の光質 (赤色光・遠赤色光比) と温度を自然環境に近づけることで再現できる。こうして再構成した条件では、CO タンパク質の蓄積量が朝夕の 2 回起こることが明らかとなり、これが野外の FT 遺伝子の発現に重要であることが示された (Song et al. 2018)。特に遠赤色光は朝の FT 誘導に必須であり、その発現レベルは、前日から翌朝までに受容したシグナル量の総和に支配される (Lee et al. 2023)。一方で温度については、少なくとも朝晩の冷え込みが主として夕方の FT を抑制することは分かっていたが、詳細な分子メカニズムは不明であった。

3. 恒常的低温と変動温度による花成制御

温度変動条件下の花成制御メカニズムについて解説する前に、まず恒常的な温度条件下での FT 転写制御についての先行研究を紹介する (図 2)。ここで扱うのは、シロイヌナズナにとってストレスにならない程度の低温 (ambient temperature) であり、長期の低温記憶である春化 (vernalization) とは異なるシグナル経路である。

15°C 前後の低温処理による花成遅延において中心的な役割を担うのが、MADS 型転写因子である *SHORT VEGETATIVE PHASE* (SVP) と *FLOWERING LOCUS M* (FLM) である (Lee et al. 2013; Lee et al. 2007; Posé et al. 2013)。低温条件下では、FLM の転写産物が温度依存的な選択的スプライシングを受け、転写抑制因子として機能するアイソフォーム FLM-β の割合が増加する (Capovilla et al. 2017; Lee et al. 2013; Posé et al. 2013)。同時に、SVP タンパク質自体も温度感受性が高く、高温下ではプロテアソーム系によって速やかに分解されるが、低温下では安定して蓄積する (Jin et al. 2024; Lee et al. 2025a)。低温によって蓄積した SVP と FLM-β は複合体を形成して FT や *SOC1* のプロモーター領域に存在する CArG モチーフに直接結合し、その転写を強力に抑制することで開花を遅延させる (Lee et al. 2013; Lee et al. 2007)。実際に、*svp* 変異体は低温下でも早期開花を示し、温度変化に対する感受性が著しく低下する (Lee et al. 2007)。

SVP と並ぶ低温下の花成抑制因子として、RING 型 E3 ユビキチンリガーゼである *HIGH EXPRESSION OF OSMOTICALLY RESPONSIVE GENE 1* (HOS1) や *HOS15* を介した経路も同定されている (Ahn et al. 2023; Jung et al. 2012; Lazaro et al. 2012; Lee et al. 2012)。HOS1 は低温下で CO タンパク質を、HOS15 は花成促進因子である *GIGANTEA* をユビキチン化し、プロテアソーム系による分解を誘導する (Ahn et al. 2023; Jung et al. 2012; Lazaro et al. 2012)。このほか、低温は CO タンパク質の分解を促進するだけでなく、その転写レベルでも抑制をかける。*CYCLING*

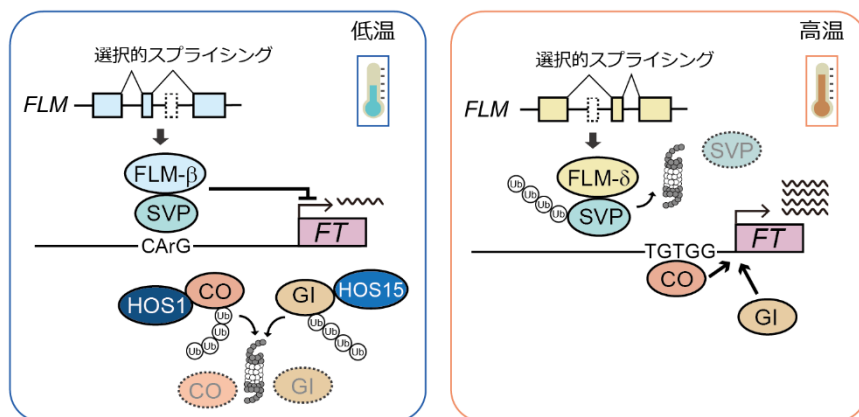


図 2. 低温下の花成制御機構

低温下では *FLM-β* の転写量が増加し、生じた SVP-FLMβ タンパク質複合体が FT の転写を直接抑制する。高温では *FLM-δ* が SVP と複合体を形成することで、SVP を 26S プロテアソームによる分解系に導く。HOS1 や HOS15 は、低温下で花成促進因子である CO や GI を分解する。

DOF FACTOR (*CDF*) ファミリーに属する *CDF6* は、低温によってその発現が誘導される転写因子であり、*CO* や *FT* の日中の発現上昇を抑制する (Blair et al. 2022)。

上述の内容は恒常低温下における花成抑制機構であるが、自然界のような変動温度環境下では、これらの因子の役割はより複雑になる。例えば春化経路に関連する一部の変異体系統では、温度変動条件下では一定温度条件と比較して開花遅延の表現型が劇的に軽減することが知られている (Burghardt et al. 2016; Wilczek et al. 2009)。これらの結果は、一般的な実験室条件で用いられる恒常的な温度条件では、春化経路の効果が過大評価される傾向を示唆するとともに、温度変動が花成制御因子の機能を大きく変化させる可能性を意味している。温度が絶えず変化する野外環境においては、既知の花成制御因子の機能は変化するだろうか？ そうであれば、1日のいつ・どの程度の温度シグナルが重要なのか、そうした時間特異的な制御機構に生物学的な意味はあるだろうか？

これらの問いに答えるために筆者らは、*FT* 遺伝子の発現様式を指標として、野外のような連続的な温度変動を最高・最低の2段階変動に単純化した2段階温度系(例：夜間 16°C, 日中 22°C)を確立した。春季の気象データを解析すると、日中の気温は日によって大きく変動するのに対し、夜間から朝にかけての気温はより変動が少なく、季節の進行に伴い安定して上昇する傾向が見られる。そこで我々は、植物がこの時間帯の温度を、より信頼性の高い季節進行の指標として利用しているのではないかと考えた。この仮説を検証するため、我々は2段階温度系を用いて、夜間から朝にかけての低温が *FT* のダブルピークをどのように制御しているかを解析した。夜間から朝にかけての温度を段階的に低くすると、それに伴い夕方の *FT* 発現が顕著に抑制された。驚くべきことに、この抑制は日中の温度が全ての条件で 22°C に保たれているにもかかわらず観察された。朝晩が肌寒い条件では、日中の温度が上昇した後も、夕方にかけての *CO* タンパク質の蓄積が著しく抑制されると同時に、*SVP-FLM* 複合体の *FT* 遺伝子座上への結合も高く維持されていた。これは、夜間から朝にかけての低温情報が、その後の日中の分子状態に持続的な影響を及ぼすことを示唆している。

夕方とは対照的に、朝の *FT* 発現はより直接的なメカニズムで抑制されていた。RNA シーケンス解析により、夜間から朝の気温が低下すると、朝の時間帯に *BBX* ファミリーに属する *BBX29* および *BBX31* の転写が、維管束組織で強く誘導されることが分かった。*bbx29 bbx31* 二重変異体は、朝晩の冷え込みに対する応答が鈍化し、低温下の朝の *FT* 発現ピークの抑制や開花遅延が、野生株と比較して緩和された。興味深いことに、*BBX29* は *FT* の転写開始点だけでなく、上流のエンハンサー領域にも多く結合する。朝晩の冷え込みによって蓄積した *BBX29* は、*CO* タンパク質を介して *FT* 遺伝子座にリクルートされたのち、*CO* の転写活性を阻害するとともに *FT* 周辺のクロマチン構造を変化させることで、*FT* 遺伝子座のヒストン修飾を変化させ、朝の *FT* 発現を抑制していると考えている (図 3, Kubota et al. 2025)。

BBX29 の花成制御については、花成促進および花成抑制の双方を示唆する報告が存在する (Lee et al. 2025b; Wang et al. 2021)。これらの報告は一見矛盾するようにも映る。しかし、こうした機能の差は前述の温度条件の違いに由来しており、*BBX29* の機能が固定的ではない可能性を意味すると筆者は捉えている。すなわち、我々が用いたような春を模した温度変動条件では、*BBX29* は涼しい朝に一時的に機能する「ブレーキ」として作用する一方、「恒常的な準最適温

度」下では、植物全体の花成能力が抑制されている中で、BBX29 は相互作用相手を別の転写因子に変えることで花成を促進する適応的な役割を担うのかもしれない。

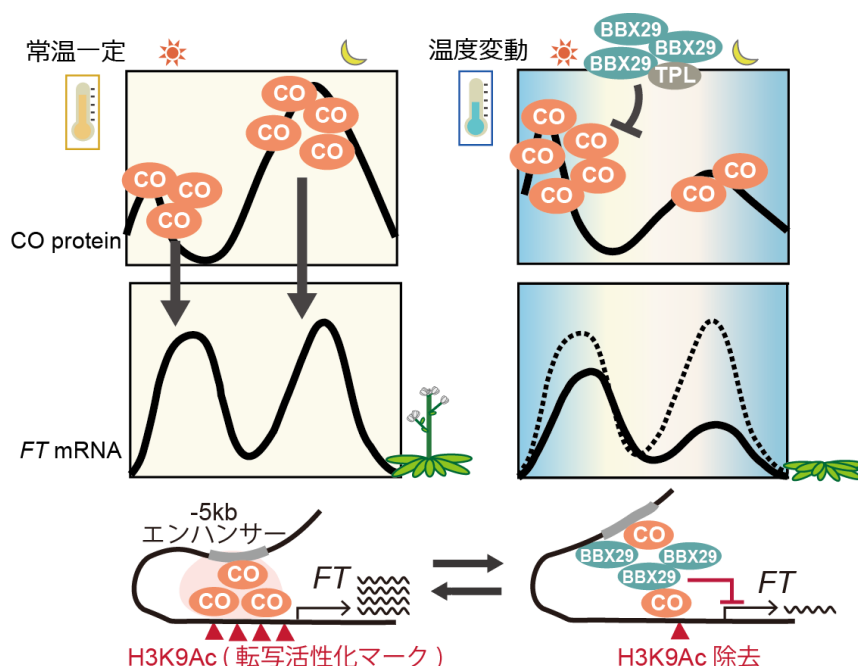


図 3. CO-BBX29 複合体を介した花成制御機構

(左) 温度一定の常温では、朝夕に蓄積した CO タンパク質が *FT* 遺伝子座近傍に結合し、転写を活性化する。
(右) 温度変動条件では、朝には BBX29 を介した CO の転写活性阻害、夕方には CO タンパク質の蓄積阻害が起これることで、朝夕の *FT* 発現が減少し、花成が遅延する。

BBX29-CO 複合体による抑制系と並行して、別の分子メカニズムも朝 *FT* の発現抑制に関与している。夜間から朝にかけての低温は、青色光受容体 ZEITLUPE (ZTL) タンパク質の蓄積を促進し、これが *FT* の転写リプレッサーである TARGET OF EATS (TOE) タンパク質と相互作用して、朝 *FT* の発現を抑制することも示された (Kim et al. 2024)。

このように、朝夕の *FT* 発現は、極めて厳重な監視下に置かれている。その発現は、PHYA を介した光質シグナルによって積極的に促進される一方で、低温シグナルによって少なくとも二つの独立した経路 (BBX29-CO 系と ZTL-TOE 系) を介して抑制される。このシステムにより、植物は日が長く、かつ朝の冷え込みが十分に緩和された、春の到来を確信できる条件が揃った場合にのみ、花成を開始することができる。

4. 数理モデルによる光・温度周期応答のシステムの理解

分子レベルでの詳細なメカニズム解明が進む一方で、それらの知見を統合し、個体レベルの表現型である開花時期を予測するための体系的なアプローチ、すなわち数理モデル (フェノロジーモデル) の開発も進展してきた。初期のフェノロジーモデルは、ある基準温度以上の温度を積算する「有効積算温度 (thermounit)」の概念に基づいていた。これは観測された現象と環境要因を相関させる経験的なアプローチであったが、その予測精度には限界があった。前述のように、特に光周性に位置する制御因子が明らかになると、個々の経路がモデルに組み込まれることでモデルの精度や複雑さは一気に上昇した。

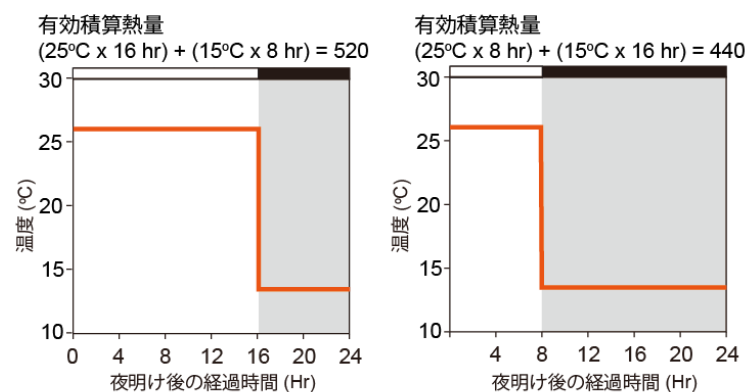
Wilczek らが 2009 年に発表した花成モデルは、春季の観測データに対しては高い予測精度を示したが、秋季のデータに対しては著しく精度が低下した (Wilczek et al. 2009)。このモデルの問題点を足がかりに、Chew らは日中温度と夜間温度の相対的な重要性が季節によって変化するという仮説を立てた (Chew et al. 2012)。彼らはモデルを拡張し、春や夏のような長日条件下では日中

の温度効果が、日が短くなる秋には夜間の温度効果が花成制御において支配的になることを示した。このモデルは後に、夜間の低温が CO タンパク質の蓄積に効果的であるという分子生物学的データによって一定の裏付けを得ることとなった (Kinmonth-Schultz et al. 2016)。

従来のモデルの多くは FT 遺伝子のタ方の「発現ピーク」を扱っていたが、フロリゲンである FT タンパク質の「物理的な蓄積」という、より現実に即した視点を導入したモデルも多く存在する (Krzymuski et al. 2015)。温度に依存する葉の発生速度や、個々の葉の齢が FT の産生能力に与える影響を組み込んだモデルも発表されており (Kinmonth-Schultz et al. 2019)、花成モデルにおける「積算温度」という抽象的な概念は、「植物全体で蓄積された FT タンパク質の総量」という、より具体的で測定可能な物理量に置き換わりつつある。現在では、植物は FT タンパク質の総蓄積量がある閾値に達した時に花成が起これと考えるモデルが一般的に受け入れられているが、より高度な検証が期待される。

こうした予測モデルを構築し検証するためには、質・量ともに十分な実験データが不可欠である。しかし Buonaiuto らは、光と温度の相互作用を調べる多くの実験デザインに「実験的共変性」という重大な問題が潜むことを指摘した (Buonaiuto et al. 2023)。光周期（日長）と温度周期（日中/夜間温度）を連動させるデザイン（例：長日＝高温時間が長い、短日＝高温時間が短い）では、光周期と 1 日あたりの総熱積算量が意図せず連動してしまうため、光周期の効果を過大評価し、温度の効果を過小評価するバイアスが生じる（図 4 上）。この問題は、モデルのパラメータ推定に深刻な影響を与えるため、実験デザインの見直しが不可欠である。Buonaiuto らが推奨する解決策の一つは、光周期と温度周期を独立に操作し、共変性を排除することである（図 4 下）。つまり、昼夜の温度変動に加えて恒常的な低温、高温条件を設定し、それらすべての条件に対して

光と温度を連動させた条件（実験的共変性を生むデザイン）



光に対して温度変動を固定した条件

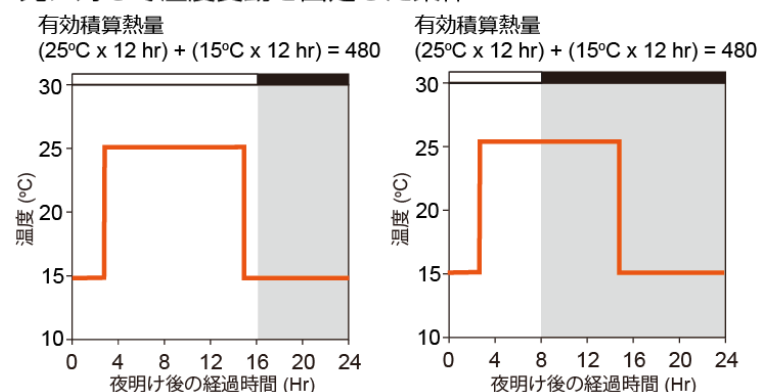


図 4. 光周期と温度周期の組み合わせの例 (Buonaiuto et al., 2023 に基づく)

(上) 光周期（日長）に合わせて高温期間を変える設計では、長日条件の方が短日条件よりも 1 日あたりの総熱積算量が増加してしまう。

(下) 温度周期（例：12 時間高温/12 時間低温）を固定し、光周期（8 時間 vs 16 時間）のみを変化させることで、総熱積算量を同一にできる。ただし、温度変化のタイミングの違いで生理応答が変化する懸念は残るため、複数の実験条件を準備する必要がある。こうした温度変動条件に加え、総熱積算量を同一にした一定温度条件（この場合は 20°C 一定）も含める必要がある。

長日短日を組み合わせることで実験的共変性を封じてしまおう、というアプローチである。我々が用いた実験デザイン（日長を固定し温度プロファイルのみを変化させる）は、まさにこの共変性を排除し、温度変動そのものの効果を解析するアプローチである。野外では温度と日長はある程度連動して変化するので、野外で起こり得るパラメータの組み合わせから帰納的に分子メカニズムをあぶり出せば、変動環境下での植物応答の理解に近づくはずである。

5. おわりに

本総説で概観したように、シロイヌナズナは、温度シグナルを時間に応じて明確に区別し、それぞれの時間帯に特化した分子メカニズムを駆使して花成タイミングを制御している。温度と時間の組み合わせは無限に存在するため、ある種パンドラの箱を開けてしまった感は否めないが、夜明けの低温を「季節シグナル」としてデコーディングする仕組みの分子実体、さらには日中と朝晩の温度差に基づく制御機構、そして光周期と温度周期の相互作用をバイアスなく解析する実験デザインの革新など、解明すべき魅力的な問いは多く存在する。

気候変動による「非対称な温暖化」（夜間温度の上昇）が予測される中、植物が光周期（Photoperiod）だけでなく、温度の日内変動という「温度周期（Thermoperiod）」の読み解き方を理解する重要性は増すばかりである。本稿が、この研究分野のさらなる発展の一助となれば幸いである。

6. 謝辞

本研究を紹介する機会を与えてくださった植物学会電子出版物編集員の皆様に深く御礼申し上げます。本稿で取り上げた我々の研究は、科学研究費補助金（研究課題番号:19K16170, 23K05817, 24H02125）、JST PRESTO（JPMJPR24N8）、奈良先端科学技術大学院大学支援財団、住友財団、三菱財団、千里ライフサイエンス財団による助成の下行われました。この場を借りて御礼申し上げます。

7. 引用文献

- Ahn G, Park HJ, Jeong SY, Shin G-I, Ji MG, Cha J-Y, Kim J, Kim MG, Yun D-J, Kim W-Y (2023) HOS15 represses flowering by promoting GIGANTEA degradation in response to low temperature in Arabidopsis. *Plant Communications* 4:100570. doi: 10.1016/j.xplc.2023.100570
- Andrés F, Coupland G (2012) The genetic basis of flowering responses to seasonal cues. *Nature Reviews Genetics* 13:627-639. doi: 10.1038/nrg3291
- Ben-Naim O, Eshed R, Parnis A, Teper-Bamnolker P, Shalit A, Coupland G, Samach A, Lifschitz E (2006) The CCAAT binding factor can mediate interactions between CONSTANS-like proteins and DNA. *Plant J* 46:462-476. doi: 10.1111/j.1365-313X.2006.02706.x
- Blair EJ, Goraloglia GS, Lincoln MJ, Imaizumi T, Nagel DH (2022) Clock-controlled and cold-Induced *CYCLING DOF FACTOR6* alters growth and development in Arabidopsis. *Front Plant Sci* 13:919676. doi: 10.3389/fpls.2022.919676

- Buonaiuto DM, Donahue MJ, Wolkovich EM (2023) Experimental designs for testing the interactive effects of temperature and light in ecology: The problem of periodicity. *Functional Ecology* 37:1747-1756. doi: 10.1111/1365-2435.14329
- Burghardt LT, Runcie DE, Wilczek AM, Cooper MD, Roe JL, Welch SM, Schmitt J (2016) Fluctuating, warm temperatures decrease the effect of a key floral repressor on flowering time in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol* 210:564-576. doi: 10.1111/nph.13799
- Capovilla G, Symeonidi E, Wu R, Schmid M (2017) Contribution of major FLM isoforms to temperature-dependent flowering in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of experimental botany* 68:5117-5127. doi: 10.1093/jxb/erx328
- Chew YH, Wilczek AM, Williams M, Welch SM, Schmitt J, Halliday KJ (2012) An augmented *Arabidopsis* phenology model reveals seasonal temperature control of flowering time. *New Phytol* 194:654-665. doi: 10.1111/j.1469-8137.2012.04069.x
- Golembeski GS, Imaizumi T (2015) Photoperiodic regulation of florigen function in *Arabidopsis thaliana*. *Arabidopsis Book* 13:e0178. doi: 10.1199/tab.0178
- Graeff M, Straub D, Eguen T, Dolde U, Rodrigues V, Brandt R, Wenkel S (2016) MicroProtein-mediated recruitment of CONSTANS into a TOPLESS trimeric complex represses flowering in *Arabidopsis*. *PLoS Genet* 12:e1005959. doi: 10.1371/journal.pgen.1005959
- Hayama R, Sarid-Krebs L, Richter R, Fernandez V, Jang S, Coupland G (2017) PSEUDO RESPONSE REGULATORS stabilize CONSTANS protein to promote flowering in response to day length. *EMBO J* 36:904-918. doi: 10.15252/embj.201693907
- Jang S, Marchal V, Panigrahi KC, Wenkel S, Soppe W, Deng XW, Valverde F, Coupland G (2008) *Arabidopsis* COP1 shapes the temporal pattern of CO accumulation conferring a photoperiodic flowering response. *EMBO J* 27:1277-1288. doi: 10.1038/emboj.2008.68
- Jenkitkonchai J, Marriott P, Yang W, Sriden N, Jung JH, Wigge PA, Charoensawan V (2021) Exploring *PIF4*'s contribution to early flowering in plants under daily variable temperature and its tissue-specific flowering gene network. *Plant Direct* 5:e339. doi: 10.1002/pld3.339
- Jin S, Ahn JH (2021) Regulation of flowering time by ambient temperature: repressing the repressors and activating the activators. *New Phytol* 230:938-942. doi: 10.1111/nph.17217
- Jin S, Youn G, Kim SY, Kang T, Shin H-y, Jung J-Y, Seo PJ, Ahn JH (2024) The CUL3-LFH1-UBC15 ubiquitin ligase complex mediates SHORT VEGETATIVE PHASE degradation to accelerate flowering at high ambient temperature. *Plant Communications* 5. doi: 10.1016/j.xplc.2024.100814
- Jung JH, Seo PJ, Park CM (2012) The E3 ubiquitin ligase HOS1 regulates *Arabidopsis* flowering by mediating CONSTANS degradation under cold stress. *J Biol Chem* 287:43277-43287. doi: 10.1074/jbc.M112.394338
- Karsai I, Szucs P, Koszegi B, Hayes PM, Casas A, Bedo Z, Veisz O (2008) Effects of photo and thermo cycles on flowering time in barley: a genetical phenomics approach. *Journal of experimental botany* 59:2707-2715. doi: 10.1093/jxb/ern131

- Kim H, Kang HW, Hwang DY, Lee N, Kubota A, Imaizumi T, Song YH (2024) Low temperature-mediated repression and far-red light-mediated induction determine morning *FLOWERING LOCUS T* expression levels. *J Integr Plant Biol* 66:103-120. doi: 10.1111/jipb.13595
- Kinmonth-Schultz HA, MacEwen MJS, Seaton DD, Millar AJ, Imaizumi T, Kim S-H (2019) An explanatory model of temperature influence on flowering through whole-plant accumulation of *FLOWERING LOCUS T* in *Arabidopsis thaliana*. *in silico Plants* 1. doi: 10.1093/insilicoplants/diz006
- Kinmonth-Schultz HA, Tong X, Lee J, Song YH, Ito S, Kim SH, Imaizumi T (2016) Cool night-time temperatures induce the expression of *CONSTANS* and *FLOWERING LOCUS T* to regulate flowering in *Arabidopsis*. *New Phytol* 211:208-224. doi: 10.1111/nph.13883
- Krzymuski M, Andrés F, Cagnola JJ, Jang S, Yanovsky MJ, Coupland G, Casal JJ (2015) The dynamics of *FLOWERING LOCUS T* expression encodes long-day information. *The Plant Journal* 83:952-961. doi: 10.1111/tpj.12938
- Kubota A, Kondo Y, Takagi H, Muranaka T, Yamaguchi N, Sugano SS, Nagano AJ, Endo M, Imaizumi T (2025) Seasonal changes in daily temperature fluctuation control flowering through a time-dependent regulation of *FLOWERING LOCUS T* in *Arabidopsis*. *Research square*. doi: 10.21203/rs.3.rs-7234857/v1
- Kumimoto RW, Zhang Y, Siefers N, Holt BF, 3rd (2010) NF-YC3, NF-YC4 and NF-YC9 are required for *CONSTANS*-mediated, photoperiod-dependent flowering in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 63:379-391. doi: 10.1111/j.1365-3113X.2010.04247.x
- Lazaro A, Valverde F, Pineiro M, Jarillo JA (2012) The *Arabidopsis* E3 ubiquitin ligase HOS1 negatively regulates *CONSTANS* abundance in the photoperiodic control of flowering. *Plant Cell* 24:982-999. doi: 10.1105/tpc.110.081885
- Lee HG, Kim J, Park K-H, Lee H, Kim S-B, Jung J-Y, Gwak E, Ahn JH, Jung J-H, Lee J-C, Seo PJ (2025a) High-temperature-induced FKF1 accumulation promotes flowering through the dispersion of GI and degradation of SVP. *Nature Plants* 11:1282-1297. doi: 10.1038/s41477-025-02019-4
- Lee JH, Kim JJ, Kim SH, Cho HJ, Kim J, Ahn JH (2012) The E3 ubiquitin ligase HOS1 regulates low ambient temperature-responsive flowering in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 53:1802-1814. doi: 10.1093/pcp/pcs123
- Lee JH, Ryu HS, Chung KS, Pose D, Kim S, Schmid M, Ahn JH (2013) Regulation of temperature-responsive flowering by MADS-Box transcription factor repressors. *Science* 342:628-632. doi: 10.1126/science.1241097
- Lee JH, Yoo SJ, Park SH, Hwang I, Lee JS, Ahn JH (2007) Role of *SVP* in the control of flowering time by ambient temperature in *Arabidopsis*. *Genes Dev* 21:397-402. doi: 10.1101/gad.1518407
- Lee N, Ozaki Y, Hempton AK, Takagi H, Purusuwashii S, Song YH, Endo M, Kubota A, Imaizumi T (2023) The *FLOWERING LOCUS T* gene expression is controlled by high-irradiance response and external coincidence mechanism in long days in *Arabidopsis*. *New Phytol* n/a. doi: 10.1111/nph.18932
- Lee P-L, Su Y-T, Chen J-C (2025b) BBX29 negatively regulates flowering in *Arabidopsis* in both long-day and short-day. *Plant Molecular Biology Reporter*. doi: 10.1007/s11105-025-01541-1

- Liu LJ, Zhang YC, Li QH, Sang Y, Mao J, Lian HL, Wang L, Yang HQ (2008) COP1-mediated ubiquitination of CONSTANS is implicated in cryptochrome regulation of flowering in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 20:292-306. doi: 10.1105/tpc.107.057281
- Liu Y, Lin G, Yin C, Fang Y (2020) B-box transcription factor 28 regulates flowering by interacting with constans. *Sci Rep* 10:17789. doi: 10.1038/s41598-020-74445-7
- Marten-Rodriguez S, Cristobal-Perez EJ, de Santiago-Hernandez MH, Huerta-Ramos G, Clemente-Martinez L, Krupnick G, Taylor O, Lopezariza-Mikel M, Balvino-Olvera FJ, Senties-Aguilar EM, Diaz-Infante S, Aguirre Jaimes A, Novais S, Cortes-Flores J, Lobo-Segura J, Fuchs EJ, Delgado-Carrillo O, Ruiz-Mercado I, Sayago-Lorenzana R, Perez-Arroyo K, Quesada M (2025) Untangling the complexity of climate change effects on plant reproductive traits and pollinators: A systematic global synthesis. *Glob Chang Biol* 31:e70081. doi: 10.1111/gcb.70081
- Posé D, Verhage L, Ott F, Yant L, Mathieu J, Angenent GC, Immink RGH, Schmid M (2013) Temperature-dependent regulation of flowering by antagonistic FLM variants. *Nature* 503:414. doi: 10.1038/nature12633
- Romero JM, Serrano-Bueno G, Camacho-Fernandez C, Vicente MH, Ruiz MT, Perez-Castineira JR, Perez-Hormaeche J, Nogueira FTS, Valverde F (2024) CONSTANS, a HUB for all seasons: How photoperiod pervades plant physiology regulatory circuits. *Plant Cell* 36:2086-2102. doi: 10.1093/plcell/koae090
- Sarid-Krebs L, Panigrahi KC, Fornara F, Takahashi Y, Hayama R, Jang S, Tilmes V, Valverde F, Coupland G (2015) Phosphorylation of CONSTANS and its COP1-dependent degradation during photoperiodic flowering of *Arabidopsis*. *Plant J* 84:451-463. doi: 10.1111/tpj.13022
- Song YH, Kubota A, Kwon MS, Covington MF, Lee N, Taagen ER, Laboy Cintron D, Hwang DY, Akiyama R, Hodge SK, Huang H, Nguyen NH, Nusinow DA, Millar AJ, Shimizu KK, Imaizumi T (2018) Molecular basis of flowering under natural long-day conditions in *Arabidopsis*. *Nat Plants* 4:824-835. doi: 10.1038/s41477-018-0253-3
- Song YH, Smith RW, To BJ, Millar AJ, Imaizumi T (2012) FKF1 conveys timing information for CONSTANS stabilization in photoperiodic flowering. *Science* 336:1045-1049. doi: 10.1126/science.1219644
- Takagi H, Hempton AK, Imaizumi T (2023) Photoperiodic flowering in *Arabidopsis*: Multilayered regulatory mechanisms of *CONSTANS* and the florigen *FLOWERING LOCUS T*. *Plant Commun* 4:100552. doi: 10.1016/j.xplc.2023.100552
- Thingnaes E, Torre S, Ernstsén A, Moe R (2003) Day and night temperature responses in *Arabidopsis*: Effects on gibberellin and auxin content, cell size, morphology and flowering time. *Annals of Botany* 92:601-612. doi: 10.1093/aob/mcg176
- Wang CQ, Guthrie C, Sarmast MK, Dehesh K (2014) BBX19 interacts with CONSTANS to repress *FLOWERING LOCUS T* transcription, defining a flowering time checkpoint in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 26:3589-3602. doi: 10.1105/tpc.114.130252

- Wang H, Pan J, Li Y, Lou D, Hu Y, Yu D (2016) The DELLA-CONSTANS transcription factor cascade integrates gibberellic acid and photoperiod signaling to regulate flowering. *Plant Physiology* 172:479-488. doi: 10.1104/pp.16.00891
- Wang MJ, Ding L, Liu XH, Liu JX (2021) Two B-box domain proteins, BBX28 and BBX29, regulate flowering time at low ambient temperature in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol* 106:21-32. doi: 10.1007/s11103-021-01123-1
- Wendell M, Ripel L, Lee Y, Rognli OA, Torre S, Olsen JE (2017) Thermoperiodic control of floral induction involves modulation of the diurnal *FLOWERING LOCUS T* expression pattern. *Plant Cell Physiol* 58:466-477. doi: 10.1093/pcp/pcw221
- Wilczek AM, Roe JL, Knapp MC, Cooper MD, Lopez-Gallego C, Martin LJ, Muir CD, Sim S, Walker A, Anderson J, Egan JF, Moyers BT, Petipas R, Giakountis A, Charbit E, Coupland G, Welch SM, Schmitt J (2009) Effects of genetic perturbation on seasonal life history plasticity. *Science* 323:930-934. doi: 10.1126/science.1165826
- Yin X, Kropff MJ, Goudriaan JAN (1996) Differential effects of day and night temperature on development to flowering in rice. *Annals of Botany* 77:203-213. doi: 10.1006/anbo.1996.0024
- Yu B, Hu Y, Hou X (2025) More than flowering: CONSTANS plays multifaceted roles in plant development and stress responses. *J Integr Plant Biol* 67:425-439. doi: 10.1111/jipb.13798
- Zuo Z, Liu H, Liu B, Liu X, Lin C (2011) Blue light-dependent interaction of CRY2 with SPA1 regulates COP1 activity and floral initiation in *Arabidopsis*. *Current Biology* 21:841-847. doi: 10.1016/j.cub.2011.03.048

再び脚光を浴びる極小被子植物ウキクサの植物科学と応用可能性

伊藤 照悟

京都大学大学院 理学研究科
〒606-8502 京都市左京区北白川追分町

The Revival of the Tiny Angiosperm Duckweed and Its Potential in Plant Science and Applications

Shogo Ito

Department of Botany, Graduate School of Science, Kyoto University,
Kita-shirakawa, Oiwake-cho, Sakyou-ku, Kyoto, 606-8502, Japan

Keywords: cryopreservation, duckweed, seasonal adaptation, species identification, stable transformation,

DOI: 10.24483/bsj-review.16c3.00287

1. はじめに：ウキクサ研究の再興と意義

ウキクサ植物は極小で、実験室内で無菌的、半永久的に栄養繁殖が可能であるため、我が国の植物生理学の研究で古くから使われてきた研究材料である。しかしながら、ゲノムの情報、分子生物学のツールなどが利用困難であったことから、ウキクサ研究は一旦縮小・衰退してしまった。近年の次世代シーケンサー（NGS）技術の発達により、他の作物と同様にウキクサ植物のゲノム情報が解読され、様々な分子生物学ツールが利用可能となったことで、ウキクサ植物を用いた研究分野は再び活発化している（Acosta et al. 2021）。全球的に分布するウキクサは環境への応答性や形態的な多様性・可塑性があり、植物の発達や環境応答を解析する上で理想的な研究材料である。また、非常に速い増殖速度と高いタンパク質含有量、または、高デンプン含量を達成できることから、バイオ燃料や家畜飼料への応用研究も展開されている。今後、地球温暖化による生育環境の変動が進む中で、効率的な代謝や生育制御を可能にするための分子レベルでの解析が一層発展していくと考えられる。本稿は、読者の皆様が、ウキクサ植物を研究材料として新たに導入することで、各自の研究分野をさらに進展させる契機となることを期待している。以下では、ウキクサ植物を用いる際の利点と課題を整理するとともに、我々の研究グループを含む最新の研究動向を概説したい。

2. ウキクサの形態と発達：極小被子植物の生物学的特徴

ウキクサ植物は単子葉植物であり、これまでサトイモ科（Araceae）のウキクサ亜科（Lemnoideae）に分類されてきたが、近年では旧分類体系のウキクサ科（Lemnaceae）の名称を用いることが一般的となっている。現在、5 属、35 種、3 雑種に分類されているが、今後も

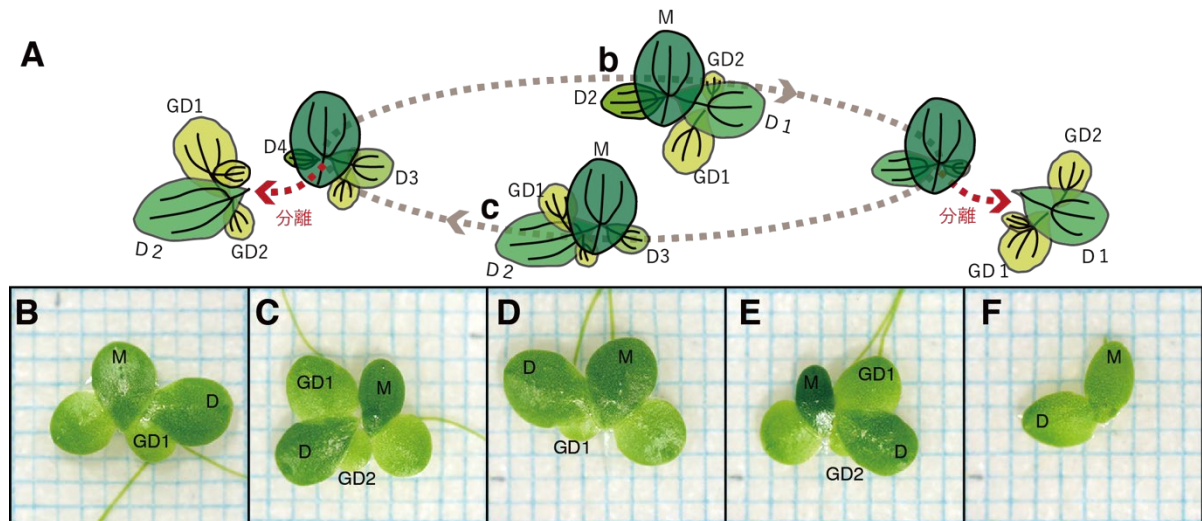


図 1. *Spirodela*, *Landoltia*, *Lemna* 属における共通したコロニーの形態と栄養成長様式

A: *Spirodela*, *Landoltia*, *Lemna* 属における共通した成長模式図。親フロンドの維管束の収束点の裏側から根が伸びる。子フロンドは親フロンドの維管束収束点付近にある左右 2 箇所の分裂組織から発達する。B, C: 右利きのムラサキウキクサ。最も成熟した親フロンド (Mother) から右側に発達した子フロンド (Daughter 1) に着目すると、子フロンドから発達した初発の孫フロンド (Grand Daughter 1) は右側から出現している。C も親フロンド (M) から左側に発達した子フロンド (D) の初発の孫フロンド (GD1) は右側に出現している。D, E: 左利きのムラサキウキクサ。同様に子フロンド (D) に着目することで孫フロンド (GD1) が左側から発達している。F: アオウキクサ。左右の利き手判断は不可能。

ゲノムの解読や、雑種・倍数性の解析の進展により、種分類は改訂されていくと予想される (Braglia et al. 2021a, 2024; Stepanenko et al. 2025)。本節では、まずウキクサ植物の形態と増殖様式について簡単に紹介する。個体の基本単位 (Phytomer) は、茎から進化したと思われる葉状体 (フロンド, frond) である。複数のクローナルなフロンドが結合した状態の個体群をコロニーと呼ぶ。ウキクサ属 (*Spirodela*)、ヒメウキクサ属 (*Landoltia*) では、1 つのフロンドの維管束収束点の下面から複数の根が生じる。一方、アオウキクサ属 (*Lemna*) ではフロンドから 1 本の根が生じる。これら 3 属ではフロンド内の根の付け根付近に位置する左右の袋状構造 (ポケット, budding pocket) それぞれに分裂組織が存在し、左右交互に無性的な新たな葉状体 (英語では mother, daughter, ground daughter frond 表記される。本稿では親, 子, 孫フロンドとする。) を形成する (吉田 2023; Mateo-Elizalde et al. 2023)。この左右のフロンド発生順序は固定されており、半永久的に栄養成長 (繁殖) を続けるに当たり、その関係が逆転することはない。ただし、有性生殖を経て種子から発芽した個体では、左右の順序が反転した株がほぼ半数出現することから、左右の発達順序は遺伝的に固定されているわけではなく、胚発生過程のゆらぎにより確率的に決定されると考えられている。親フロンドのポケットから子フロンドが出現する側を下向き (手前側) に配置した場合、図 1A には、右側の分裂組織 (primary meristem) が先に奇数番目の子フロンドを、左側の分裂組織 (secondary meristem) が偶数番目の子フロンドを交互に発生させる *Lemna* 属のウキクサ植物の模式図を示す (筆者はこれを「右利きウキクサ」と呼称している。) 十分に成長した子フロンドは親フロンドとの物質輸送を担う連結柄 (stipe) がちぎれて独立した個体となる。図 1B は右利きのムラサキ

コウキクサ (*Le. japonica*) の例であり、図 1A 中の b に対応する。図 1C では、親フロンド (M) から発達した左側の子フロンド (D) が右側の子フロンドより大きい、これは右側に発達した奇数番目のフロンドが独立した直後のコロニーであり、やはり右利きの株である (図 1A 中の c に対応)。左側の子フロンド (D) に着目すると、1 番目の孫フロンド (GD1) は右側から出ていることから、右利きであると判定できる。一方、図 1D および E は左側が先に発達する「左利き株」である。コロニー内の最も古い親フロンド (M) から出現している子フロンド (D) の大きさから利き手 (左右) を判断することはできず、子フロンド (D) から出現する孫フロンド (GD1) の出現順序に基づいて判定する必要があることが理解されるだろう。図 1F は親フロンドと子フロンドからなるアオウキクサ (*Le. aequinoctialis*, または、後述するように、筆者らは *Lemna aoukikusa* あるいは *Lemna* × *aoukikusa* の学名の使用を推奨している。) のコロニーを示す。この段階では孫フロンドが存在しないため、利き手の判定は不可能である。一般に、コロニーを構成するフロンド数は、子フロンドの発生速度と成熟した子フロンドの独立速度の関係で決まる。すなわち、生育環境が良好であればコロニーあたりのフロンド数は増加し、貧栄養条件であれば分離が優先され、フロンド数は減少する。野外の過酷な生育条件のみならず、実験室内の無菌環境においても、培地中のショ糖の有無などによって 1 コロニーあたりのフロンド数は可塑的に変化する。野外観察において、右利き・左利きの判別は容易ではないが、ウキクサ研究を進める上で、様々な生育条件に適応した自然変異株を取得することは重要である。野外で右利き・左利きのコロニーが同一地点に混在している場合、それらは同種であったとしても遺伝的に異なる (すなわち clone ではない) 株であり、両方を採取して表現型比較をすることをお勧めする。右利きウキクサの場合、花成誘導時には花 (雄蕊および雌蕊) は必ず反対側 (左側の secondary meristem) のポケットからのみ出現する (図 4A)。したがって、花成個体を探索するときには、まず右利き・左利きを判定することが有効である。花が受粉に失敗して種子が登熟できない場合、同じポケットから新たなフロンドが出現することから、栄養繁殖を担う分裂組織は花成時期にも維持されていると考えられている。花成誘導および発達過程の詳細については、過去の BSJ レビュー 村中, 吉田を参照されたい (吉田 2023; 村中 2023)。

一方、ミジンコウキクサ属 (*Wolffia*) と *Wolffiella* 属の植物体には根や維管束が存在せず、形態はさらに単純である。栄養成長時にはフロンドに 1 箇所ある分裂組織から子フロンドが発達する。進化の方向は簡略化・単純化であり、祖先的である *Spirodela*, *Landoltia* 属から根の本数を減らし *Lemna* 属が現れ、維管束をなくし、分裂組織を 2 箇所から 1 箇所に減らした *Wolffia* 属と *Wolffiella* 属が出現したと考えられている。花成時には、フロンドのほぼ中央の表皮に亀裂が入り、鉛直方向に花 (雄蕊・雌蕊) が発達することから (図 4B), 栄養成長時に活性をもつ分裂組織とは別の分裂組織がフロンド中央内部に存在する可能性、または分化した細胞から脱分化を経て *denovo* で花芽分裂組織が新たに形成される可能性の 2 つが考えられているが、まだ結論に至っていない (Li et al. 2023)。前者の場合は *Lemna* 属の secondary meristem に相当する系譜を持つ分裂組織とみなすことができるかもしれない (Yang et al. 2021)。ミジンコウキクサ (*Wolffia*) のフロンドからプロトプラストを作成し、1 細胞レベル

での遺伝子発現解析が報告されているので、フロンド内部に隠れた休眠中の分裂祖組織の構造や発生過程について今後解析が進展する期待されている (Li et al. 2023; Denyer et al. 2024)。

3. ウキクサ植物のゲノム解読と系統分類：種再編の進展

3-1. ゲノム情報の整備

ウキクサ植物を再び植物分子生物学のモデル系として確立するためには、ゲノム情報の解読が必要不可欠である。最初に全ゲノムが解読されたのは、ウキクサ (*S. polyrhiza*) 7498 株である。様々なウキクサ植物の核 DNA 含量を flow cytometry (FCM) で定量したところ、個体サイズの最も小さい *Wolffia* 属の中で *Wolffia arrhiza* が約 2,200 Mbp とかなり大きく見積もられたのに対し、個体サイズが最も大きい祖先的な *S. polyrhiza* は DNA 含量からゲノムサイズが小さいことが推定されたためである (Wang et al. 2011; Hoang et al. 2019)。Joint Genome Institute (JGI) のプロジェクトで解読され $1C = 158\text{ Mb}$ と決定された。(Wang et al. 2014), その後、ロングリードの解析と Hi-C により染色体レベルにアセンブルされ染色体数は $2n = 40$ と決定された。*S.p.*種内の数百の株間のゲノム配列比較が行われ (*S.p.* 7498, 9509 などは配列公開), 配列の多様性は非常に低いとされた (Michael et al. 2017; Hoang et al. 2018; Bog et al. 2020, 2022b; Harkess et al. 2021; Wang et al. 2024)。ただし、形態的・生理的な表現型の多様性は大きく、一般的な被子植物よりも DNA のメチル化 (特に非対称 mCHH) レベルが低いこと, RdDM 因子, DNA メチル化維持, および RNA サイレンシング機構をコードする遺伝子の一部がゲノムから欠損しているため, エピジェネティックな制御と表現型の多様性・可塑性との因果関係について研究が進んでいる (Dombey et al. 2025)。

これ以降, *S.p.*種との比較で *Spirodela intermedia* (*S.i.* 7747, 8410), $2n = 36$ (Hoang et al. 2020), コウキクサ (*Lemna minor* 5500, 7210, 9252), $2n = 40$ (Van Hoeck et al. 2015; Ernst et al. 2025), ヒメウキクサ (*Landoltia punctata* 7733, 5635) (Baggs et al. 2022), ヒナウキクサ (*Lemna minuta* 5633), $2n = 42$ (Abramson et al. 2022), *Wolffia arrhiza* (8872a), *Wolffia australiana* (7733), $2n = 40$ (Michael et al. 2021; Park et al. 2021; Li et al. 2023) の全ゲノムが次々に公開されている。イボウキクサ (*Lemna gibba* 7742a), ムラサキコウキクサ (*Lemna japonica* 7182, 8627, 9421), キタグニコウキクサ (*Lemna turionifera*, 9434) についても染色体レベルまでアセンブルされた配列が公開されている (Ernst et al. 2025)。ナンゴクアオウキクサ (*Lemna. aequinocalis* 8011) についても現時点で論文発表されていないが, 配列は Lemna.org で限定公開されている。*Le. minor* として初期に報告された一部の株は, ゲノム配列解析および後述の倍数性解析の結果に基づき, 種名 (雑種) が *Le. japonica* に変更されているため注意が必要である。例えば, *Le. japonica* 8627 株は, 当初 *Le. minor* として報告されていたが, 配列解読の結果, 倍数性が確認され, *Le. japonica* として再分類された。祖先型の形質を保持している *S. polyrhiza* のゲノムサイズ $1C = 158\text{ Mb}$ と比較して, *Lemna* 属のゲノムサイズは $1C = 300 \sim 500\text{ Mb}$ で少し大きい。*Wolffia* 属の個体サイズは非常に小さく形態も単純化しているが, ゲノムサイズは *Wolffia* 属内の種間の差が非常に大きい。ゲノムサイズの小さい *Wolffia australiana* ($1C = 360 \sim 440\text{ Mb}$, $2n = 40$) が最初に報告された (Park et al. 2021; Li et al. 2023)。様々な研究グループが独自に全ゲノム配列を決定しているのが現状であり, 各種ごとの基礎研究用に代

表株は定まっていないが、今後株間の配列の違いなどを集約し、共通で利用できるデータベースが構築されることを期待している。上述の株に関して Lemna.org (<https://www.lemna.org/>), CoGe (<https://genomevolution.org/coge/>), WolffiaDB (<https://duckweeds.plantprofile.net/home>) などで簡便にゲノム配列を取得できるので、これらをローカル利用することをお勧めする。

3-2. DNA バーコーディングと倍数性による種分類の再検討

ウキクサ植物の種の同定は、前述の形態的な特徴により属レベルまでは簡単に分類できるが、小型で構造が簡略化されているため形態から種の同定を行うのは難しい。特に野外で発見したウキクサ植物については生育地の環境（栄養状態など）が様々なので、可塑性の高い個体サイズ・根の長さ・色などは同定の指標には使いにくい。これまで、葉緑体 DNA の配列解析によって、種の同定が簡便に行われていた (Bog et al. 2015)。主に、*atpF-atpH* および *psbK-psbI* の遺伝子間領域が用いられてきたが、近縁種で差がない場合は *rbcL*, *matK* 遺伝子領域, *trnK*, *rpl16* インترون領域も使用される。*Le. minor* と *Le. japonica* については、これまで葉緑体配列 *atpF-atpH* 領域などでは完全一致し分離が不可能であった。近年のゲノム解析と後述の核ゲノムの倍数性解析により、*Le. minor* (M) を母方親、*Le. turionifera* (T) を父親（花粉）側にして、形成された雑種の存在が明らかとなった。4 (MMTT) または 3 倍体 (MMT) の倍数性を持った個体であり、世界中に分布していることがわかった (Braglia et al. 2021b; Volkova et al. 2023; Schmid et al. 2024; Ernst et al. 2025)。2 倍体の種を *Le. minor*, 倍数性の雑種を *Le. japonica* とすることが国際ウキクサ会議 (International Conference on Duckweed Research and Applications; ICDRA) にて提案され、*Lemna × japonica* と今後は表記されることが増えていく可能性が高い。北海道大学植物園で森川正章博士によって取得され、日本において様々な研究で使用されてきた *Le. japonica* (*Lemna × japonica*) 5512 株（通称 Hokumori 株）は、報告初期は *Le. minor* とされたが、ゲノム解読の結果、倍数性が確認され、現在は *Le. japonica* (*Lemna × japonica*) に統一されつつある。ヨーロッパでも同様の報告があり、*Le. gibba*, *Le. minor* を父、母方親またはその逆とする雑種を *Lemna × mediterranea* として報告している (Braglia et al. 2024; Romano et al. 2025)。日本国内で分類が難しいとされてきたアオウキクサについても、倍数性の解析が進んでいる。ウキクサ植物の分類と生体研究の第一人者である Elias Landolt 博士 (1926-2013 彼の詳細なモノグラフ “*Lemnaceae – a Monographic Study*” は、現在もウキクサ研究の基礎文献として高く評価されている。(Landolt and Kandeler 1987)) がカリフォルニアで採取したアオウキクサの代表株である 6746 株は、現在は学名 *Le. aequinoctialis* が使用されている（以前は *Lemna perpusilla* や *Lemna paucicostata* が使用されていた）。短日で花成し種子のできる 6746 株の倍数性を調べたところ 4 倍体の雑種であることがわかった (Stepanenko et al. 2025)。北米の限られた地域にしか存在しない *Le. perpusilla*, 東南アジアを中心に分布する *Le. aequinoctialis* の両種は種内に 2 倍体, 3 倍体の株が見られ、それらの雑種が 6746 株だと結論付けられた。日本国内のアオウキクサは別府博士らによって 2 種 1 亜種に分類された。広く水田に分布する *Le. aoukikusa* N1 型（または Group B）, 九州以南の常緑ナンゴクアオウキクサ *Le. aequinoctialis* S 型（または Group A）そして、北陸地方に分布する亜種の *Le. aoukikusa* subsp. *hokurikuensis* N2 型である (別府 et al. 1985)。日本で優

先種となっているのは、4倍体雑種のアオウキクサ *Lemna* × *aoukikusa* (*Le. aequinoctialis* × *Le. perpusilla*) のようだ (Lee et al. 2024)。この雑種は、6746 株と同様に、自家和合で実験室内においてもよく結実し、大量の発芽可能な種子を作ることができたことが、日本の冬季における種子での越冬を可能にし、広範囲に分布を広げることができた要因であろう。近年、筆者らはナンゴクアオウキクサ *Le. aequinoctialis* S 型を和歌山県で発見している。ナンゴクアオウキクサは自家不和合性を示し、種子形成がほぼ認められないため、日本の冬季を越せないと考えられてきた。しかし、温暖化の影響により、分布の北限が変化している可能性が示唆される。*Wolffia* 属、*Wolffiella* 属についても属内の種の分離は配列情報からは不十分なものも多く、今後もゲノム配列解読、倍数性の解析の進展とともに、分類の再検討がなされる可能性は高い。

3-3. Tubulin-Based Polymorphism (TBP) を利用した簡便な種同定

野外からのウキクサ植物を採取した場合、実験に使用する目的と、予算にもよるが、無菌化を終えたあとで、種の同定に進むことが一般的である。無菌化処理の段階において、希少なウキクサを見落とさないためにも、取得したウキクサ個体群を観察し、形態による種の予想をすると同時に、フロンド発達順序の左右性の判定を強くお勧めする。前述のように、ウキクサ植物の左右性が栄養繁殖中に反転することはほぼ無い。したがって、一見、同種に見える個体も、左右性が異なれば、別種である可能性がある。または、同種であれば遺伝的に異なる別株 (clone) である可能性が高い。例えば、貧栄養環境で生育していたウキクサ個体群を採取すると、*Le. minor*, *Le. japonica*, *Le. minuta* の3種が混在していることがある。フロンドサイズ、根の長さ、表面のツヤなどでは種数の予想さえ難しいが、左右性を見れば、少なくとも2種 (または遺伝的に異なる同種2株) の存在を予想して無菌化と種同定に進むことができる。もちろん、同一箇所を取得した株において左右性が同じであっても同一クローンではない可能性にも留意しなければならない。特に *Le. aequinoctialis* と *Le. gibba* は種子ができることからその可能性が高い。ウキクサ植物の種内 (clone 株間) の多様性は非常に大きく、生理的特性が異なり、さまざまなストレス条件下での反応にも定量的な違いがあることが示されている (Bergmann et al. 2000; Sree et al. 2015)。また、倍数性の違いによって表現型の多様性は更に高まっている (Vunsh et al. 2015)。独立に複数株を無菌化して維持しておけば、様々な形質を持った貴重な株として比較研究に用いることができる。複数の無菌化株を取得した後に、近縁種の分離と雑種の同定には、葉緑体マーカー遺伝子による配列解析に加えて、 β -tubulin 遺伝子ファミリーメンバーのイントロン長多型に基づく核分子マーカーである tubulin-based polymorphism (TBP) 解析が安価で簡便である (Braglia et al. 2021a)。

ここでは β -tubulin (*TUBB1*) 遺伝子のオルソログ間における第2イントロン領域をPCR増幅することで種同定した結果を図2に示す。日本で頻繁に見られるウキクサ種はこのPCRで簡単に分離が可能である。写真の左から、ウキクサ *S. polyrhiza*, ヒメウキクサ *La. punctata* は固有な断片が増幅される。母性遺伝の葉緑体配列がほぼ一致してしまうコウキクサ *Le. minor* と、雑種のムラサキコウキクサ *Le. japonica* についても分離可能である。*Le. minor* と *Le. turionifera* ゲノム由来と思われる双方の断片が *Le. japonica* では増幅されている。前述の日本に分布するアオウキクサ類2種1亜種についても、国内の水田の優占種である雑種の *Lemna* \times *aoukikusa* N1 型には2断片が増幅され、北陸地方に分布し2倍体と思われる *Le. aoukikusa* subsp. *hokurikuensis* N2 株、鹿児島以南沖縄に分布する *Le. aequinoctialis* S 型にはそれぞれ1断片が増幅され、分離可能である。外来帰化種であるイボウキクサ *Le. gibba*, ヒナウキクサ *Le. minuta*, ミジンコウキクサ *W. globosa* についても固有の断片が増幅できる。日本での分布報告のあるチリウキクサ *Le. valdiviana* については我々の研究室で日本産の株を保持していないので今回は確認できなかった。同質倍数性については本手法では分離できないので、表現型が明らかに異なると気づいたときには、必要に応じて flow cytometry (FCM) を用いた DNA 含量の解析を組み合わせると良い。

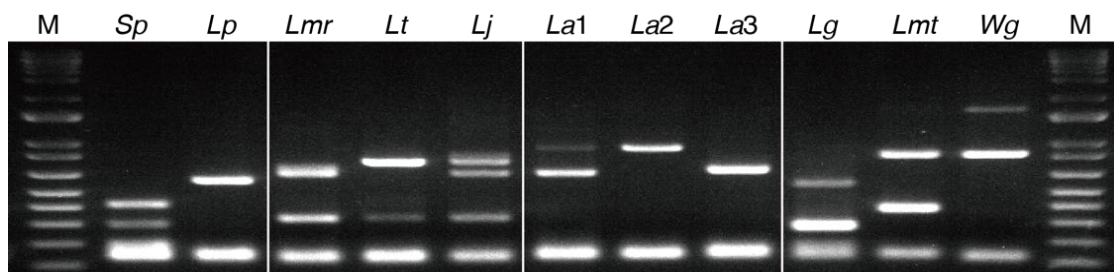


図2. Tubulin-based polymorphism (TBP) を用いた種と雑種の判定

Sp: *Spirodela polyrhiza*, *Lp*: *Landoltia punctata*, *Lmr*: *Lemna minor*, *Lt*: *Lemna turionifera* *Lj*: *Lemna japonica*, *La1*: *Lemna aoukikusa* N1 型, *La2*: *Lemna aequinoctialis* S 型, *La3*: *Lemna aoukikusa* subsp. *hokurikuensis* N2 型, *Lg*: *Lemna gibba*, *Lmt*: *Lemna minima*, *Wg*: *Wolffia globosa*

primerF: 5'-CTSAAGCTSACBAMBCCVAGCTGT-3'

primerR: 5'-AGATBARRTGRTTCAGRTCDCCRAC-3, Braglia et al. 2021 より改変

4. ゲノム情報と分子生物学ツールを駆使したウキクサ研究

4-1. 遺伝子一過的導入法と概日時解析

ここからは、分子生物学的ツールの開発とゲノム情報を利用した、生理・生態・進化・環境研究について概説する。

我々の研究グループでは、概日リズムの解析にウキクサ植物を用いている。様々なウキクサ種において、金粒子を用いた Plasmid DNA の導入による一過的な遺伝子発現に成功している (Muranaka et al. 2013; Muranaka and Oyama 2018, 2020)。ウキクサ植物は極小・扁平で、成熟したフロンド内の細胞の位置関係がほぼ変化しないため、生物発光レポーター (ルシフェラーゼ LUC) の経時変動の非侵襲的な長期測定に理想的な材料であった (Serikawa et al. 2008; Muranaka et al. 2015; Isoda and Oyama 2018; Isoda et al. 2022)。この測定系を用いて、レポータ

一の発光を頼りに、1細胞レベルの概日リズムを検出し、連続明条件下ではフロンド内（個体内）の各細胞の概日リズム位相が徐々に脱同期することを報告している（Muranaka and Oyama 2016）。また、*CaMV35S* プロモーターや *ZmUBQ* プロモーターを用いた遺伝子過剰発現、RNAi による遺伝子抑制のエフェクターも同時に同一細胞へ導入することができる。この共導入系では、周辺の細胞の概日時計が正常に機能していると考えられる中で、レポーターとエフェクター遺伝子を導入した細胞だけで概日リズムが攪乱され、概日時計の細胞自律的な性質が示されている（Serikawa et al. 2008; Ito-Miwa et al. 2014; Okada et al. 2017）。更に、近年では、波長の異なる発光レポーターを用いて 2 遺伝子の発現変動を計測したり、細胞非自律性の概日発光リズム成分の検出しており、そのリズム発生のメカニズムの解析も行っている（Watanabe et al. 2021, 2023; Horikawa et al. 2025）。一過的遺伝子導入法では様々なレポーターが導入できるため、BiFC やスプリットルシフェラーゼ（split-LUC）システム等を用いて、タンパク質の細胞内局在、タンパク質間相互作用、DNA 結合、転写活性化・抑制能など、酵母やタバコなどの代替としても使用できる。

4-2. 安定形質転換法と遺伝子機能解析および物質生産

筆者はウキクサ研究を開始した直後から安定形質転換ウキクサの作出に取り組んできた。

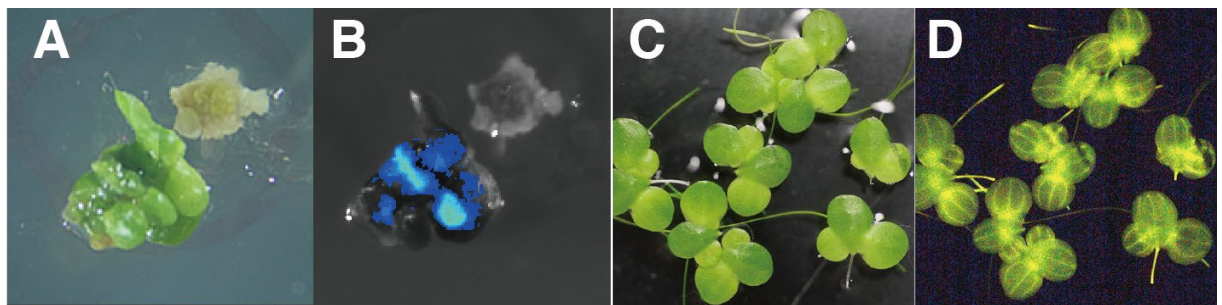


図3. ムラサキコウキクサ *Lemna japonica* 5512 株を背景とした形質転換植物体

A: アグロバクテリウム感染後、フロンド再生培地で培養後 73 日目の写真。カルスからフロンドが再生している。B: 導入した概日発光レポーター *AtCCA1ex4::LUC* 由来の発光を疑似カラーで示す。明視野との合成写真。C: 構成的発現プロモーター *ZmUBQ1::LUC* を形質転換したムラサキコウキクサの明視野。D: 発光画像。植物全体で発光が観察できる。維管束や分裂組織付近で活性が高い。この植物は暗所であれば肉眼で発光を観察できるほど明るい。作出後 10 年ほど継代しているが、いずれの植物でも生物発光は安定して検出できる。

ウキクサ植物のカルス化を経由したアグロバクテリウムとの共培養による形質転換の成功例は 2000 年代初期から報告がある。*Lemna* 属では *Le. gibba*, *Le. minor* または *Le. japonica* から成功報告が始まり（Yamamoto et al. 2001; Sun et al. 2007; Ko et al. 2011a; Chhabra et al. 2011; Canto-Pastor et al. 2015a; Kozlov et al. 2019），その後も現在に至るまで、*Le. turionifera*（Yang et al. 2017），*Le. aequinoctialis*（Liu et al. 2019; Wang et al. 2021），*Landoltia punctata*（Vunsh et al. 2007; Rival et al. 2008），*S. polyrrhiza*（Yang et al. 2018b），*Wolffia arrhiza*（Khvatkov et al. 2018, 2021; Shvedova et al. 2023），*W. globosa*（Heenatigala et al. 2018）などについて主にレポーター遺伝子の活性に基づいた成功報告がある。しかしながら、報告初期は他の研究室での再現が難しかったようである。その原因として、種内の株間の生理学的多様性の大きさや、種

同定の不正確さ、倍数性・雑種などが考えられている。特に、株間で植物ホルモン感受性などに大きな違いがあり、成功報告のあるウキクサ種においても、形質転換植物体の作出どころか、カルス誘導もできない株も多い。つまり、安定形質転換植物の作成にはどの株 (clone) を選ぶかが成否に直結することを理解していただきたい。*Le. aequinoctialis* の成功例に関しては、台湾由来の分離株を用いているので、先述のナンゴクアオウキクサ *Le. aequinoctialis* (種子のできない S 型) における成功例であると考えられる。筆者らは、本州産のアオウキクサ *Lemna* × *aoukikusa* N1 型を用いて作出を試みたが未だに成功していない。また、カルス化を経ずに植物個体 (フロンド) とアグロバクテリウムを直接共培養することで安定形質転換体の作成に成功した例もある。ガラスビーズによる振盪や減圧により、アグロバクテリウムが分裂組織に感染できるように条件検討することで安定形質転換が達成できるようだ (Ko et al. 2011b; Balaji et al. 2016; Heenatigala et al. 2018; Yang et al. 2018a)。現在はカルス化を経た形質転換が現在主流であるが、カルス化に伴う意図しない Somaclonal 変異による形態異常や生理反応異常が生じる可能性がある。また導入した遺伝子または欠損させた遺伝子の機能によってホルモン感受性や形態形成に異常を呈する場合にはウキクサ個体へ再分化させることも難しい。通常フロンド用いた形質転換法の効率・再現率が上昇すれば格段に応用の幅が上がり期待されている。

筆者らのグループでは北海道産の *Le. japonica* 5512 株で初めて形質転換体の作出に成功した。2015 年に得られたルシフェラーゼ (LUC) レポーターを導入した植物体は現在も継代培養で維持されており発現も安定している (図 3)。この植物を用いて、すべての細胞から概日発光レポーターのシグナルを検出できる特性を活かし、親・子フロンド間の時刻 (位相) 情報の関係性や、新規に発生する子フロンドの位相が比較的揃っていること、連続明条件下においてフロンド内に概日リズムの様々な位相パターンが形成されることなどを報告している (Ueno et al. 2022)。筆者らの研究室では、*Le. japonica* 5512 株に加え、日本産の *Le. minor* の 5 株、*Le. turionifera* 6619 株において形質転換に成功している (未発表)。これまでの報告では、LUC, GFP, GUS のようなレポーターだけでなく Artificial microRNA を用いた内在 *magnesium chelatase subunit* 遺伝子 (CH42) の抑制 (Canto-Pastor et al. 2015b)、CRISPR/CAS9 を用いたゲノム編集により *phytoene desaturase* 遺伝子 (PDS) への変異導入にも成功している (Liu et al. 2019)。過剰発現については、ウキクサ内で恒常的発現プロモーターを用い、様々な外来の遺伝子 (ウイルスワクチン用抗原など) が導入されている (Kubota et al. 2013; Kozlov et al. 2019)。また、 β -エストラジオールで誘導する XVE システムがムラサキコウキクサ (*Le. japonica*) で機能することが示され、4 種の外来遺伝子の導入で、脂質の蓄積を乾燥質量の最大 8.7% まで増加 (理想的な培養環境では、年間あたり 1 ヘクタールあたり約 3.3 kL (=約 3,300 L) の油を生産できる) させることにも成功しており、応用への第一歩が切り開かれている (Liang et al. 2023)。

4-3. 種子と休眠芽による生存戦略の分子解析

ウキクサ植物は至適な生育環境では爆発的に栄養繁殖する。しかし、温帯・亜寒帯における冬季や、亜熱帯地域の乾季など、季節的な環境変動が予想されるときには致死的な環境を

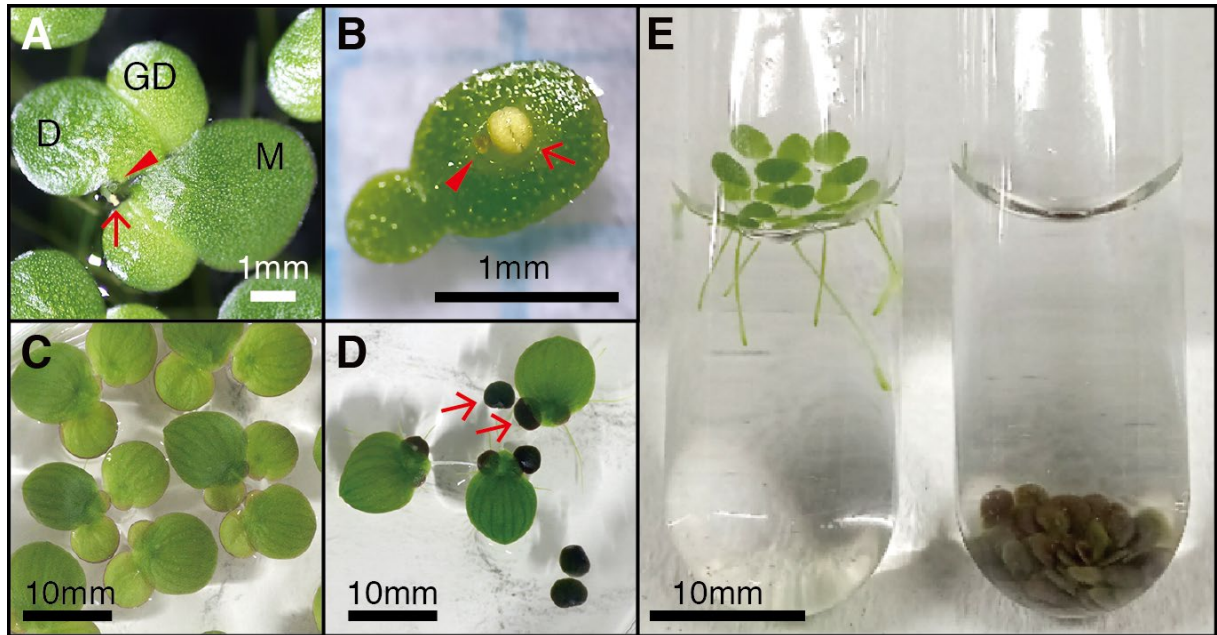


図4. ウキクサ植物の花と休眠芽の誘導

A: 花成したイボウキクサ *Lemna gibba*。長日条件 15L9D, 25°Cで生育。右利きのウキクサで、子フロンドの右側から孫フロンドが出現し、左側から雄蕊（矢印）、雌蕊（鋏）が出現している。B: 花成した *Wolffia brasiliensis*。長日条件 15L9D, 25°C, 5 μ M サリチル酸処理で生育。フロンドの中央から表皮が開裂し、雌蕊（鋏）が先に出現し、その後雄蕊（矢印）が出現する。写真の葯は未成熟で開裂していない。受精せず、種子はできない。C: ウキクサ *S. polyrrhiza* の通常栄養成長。長日条件 15L9D, 25°Cで生育。D: 低温で誘導された休眠芽（矢印）。長日条件 15L9D, 15°Cで生育。E: キタグニコウキクサ *Lemna turionifera* の通常栄養成長（左）と栄養欠乏で産生された休眠芽（右）。

回避するための生存戦略を取ることが知られている。ウキクサ植物の生活環については Mateo-Elizalde らの簡潔な総説を参照していただきたい (Mateo-Elizalde et al. 2023)。第1の生存戦略は、有性生殖で作られた種子での休眠があげられる。日本の水田に分布するアオウキクサ *Lemna* \times *aoukikusa* N1 型はその典型例であり、夏の後半に短日条件で花成が誘導され種子つけ越冬する。一方、地中海性気候地域に広く分布するイボウキクサ *Lemna gibba* は長日条件で花成し種子をつけることが古くから知られており (図4A)、生理学的な知見は蓄積している (Cleland and Briggs 1967)。しかし、日本などでは、湿潤な夏季を越せないわけではなく、長日に応答した花成と種子形成は、この種の生存に対して強い選択圧としては働いていないと考えられている。そのほかのウキクサ植物については、栄養欠乏条件やサリチル酸処理により花成が誘導されることが報告されているが (図4B)、筆者自身も種子を観察した経験がなく、自然環境下での結実条件については未解明な点が多い (Fourounjian et al. 2021)。日本の野外でコウキクサ等を観察すると、しばしば右・左利きの個体が同所で見られることから、有性生殖をしている可能性がある。しかし、自家不和合性の有無、送粉者の関与など繁殖生態に関する研究はほとんど進んでいない。日本産アオウキクサ（広義の *Le. aequinoctialis*）における花成と種子形成、短日性花成誘導、および日本各地で取得された株 (clone) 間での限界日長の違いと概日時計周期の関係については、原著論文および BSJ レビ

ューにも詳細が報告されているのでそちらを参照してほしい (Yoshida et al. 2021; Muranaka et al. 2022; 吉田 2023; 村中 2023)。

第2の生存戦略は、休眠芽（殖芽, turion）による生存である。多くの水生植物は、厳しい環境条件に対して休眠芽を発達させることが知られており、ウキクサ植物も同様の戦略をとる。休眠芽はフロンド内部に存在する分裂組織から通常フロンドの代わりに発達する器官であり、その発達過程では過剰なアントシアニンおよびデンプンの蓄積を伴う。また、通常フロンドで発達する気泡組織が形成されないため、成熟すると親フロンドから離脱して水底に沈み、越冬あるいは環境条件（光、温度、栄養状態など）が改善されるまで成長を停止する。特にウキクサ (*S. polyrhiza*) においては、研究が盛んに行われている。休眠はリン欠乏、重金属ストレス、低温など、様々な環境条件によって誘導されることが知られており、それらの条件下で網羅的な遺伝子発現変動解析も精力的に進められている (Fang et al. 2025)。これらの処理条件で内生アブシシン酸 (ABA) 濃度が上昇すること、また外因的に ABA を処理することで休眠芽形成が誘導されることから、ABA は休眠芽発達の主要な制御ホルモンであると考えられている (Wang and Messing 2012)。*S. polyrhiza* の休眠芽形成および生理については、Ziegler の総説に詳細がまとめられている (Ziegler 2024)。成熟した休眠芽は生育環境を改善しても直ちに発芽して生育を再開するわけではない。これは樹木などの越冬芽と同様に内性休眠 (endodormancy) の状態にあり、能動的な休眠機構が働いているためである。長期の低温処理などにより休眠が打破され、光刺激などの環境シグナルで発芽が誘導されると、春季に水面へ浮上し、一斉に増殖を開始する (Appenroth et al. 1989; Appenroth and Augsten 1991)。筆者らのグループは典型的な休眠芽を発達させるキタグニコウキクサ (*Le. turionifera*) を対象として休眠誘導の分子機構の解明を進めている。*Le. turionifera* では、*S. polyrhiza* と同様に ABA 処理や低温条件に加え、我々の検討では短日条件によっても休眠誘導が引き起こされることを見出している。*S. polyrhiza* では光周期に応答した休眠の誘導は観察されていない (Appenroth 2003)。*Le. turionifera* は高緯度地域に分布する種であり、日本では主に東北地方および北海道に分布している。筆者らは *Le. turionifera* の安定形質転換系の確立にも成功しており、*Le. aequinoctialis* における短日依存性花成誘導機構と比較しながら、ウキクサ植物における季節応答（光周性）機構の分子基盤解明を目指している。なお、休眠芽には乾燥重量の 60–70% に相当するデンプンが蓄積することが報告されており、その発達制御機構は応用的観点からも極めて重要な研究課題である。

4-4. ウキクサホロバイオントの理解と環境浄化・バイオマス生産への応用研究

ウキクサ植物は水生植物モデルとしてだけでなく、植物と共生・付着する微生物群を一体の生態系単位として捉える「ウキクサホロバイオント (duckweed holobiont)」研究のモデルとして注目されている。ウキクサ植物は無菌化が容易であり、一般的な陸上植物と異なり、微生物群集との相互作用を制御・再構成できる優れた実験系を構築できる。ウキクサ表面の細菌群は陸上植物の葉に存在する細菌群と類似していることも報告されている (Acosta et al. 2020)。ムラサキコウキクサ (*Lemna japonica*) 5512 株では、表面に定着する細菌群の中から代表的な細菌種を選定し、合成細菌群 (SynCom) システムが構築されている (Ishizawa et al.

2020)。構築した SynCom はウキクサの生育に影響を与えることが確認されており、ウキクサをモデル植物として、植物と微生物の相互作用を詳細に解析するための新たな実験系となっている (Ishizawa et al. 2025)。さらに、ウキクサから分離されたいくつかの細菌株が植物成長促進作用 (Plant Growth-Promoting Effect) を示すことも報告されており (Suzuki et al. 2014; Toyama et al. 2017; Makino et al. 2022)，これらの微生物はウキクサ自身の生育促進やストレス耐性向上に寄与することが明らかになっている。その分子メカニズムについては、ウキクサ植物と微生物の双方の側面から解析が進められている。(Ishizawa et al. 2017a)。ここで留意すべき点として、日本の環境工学分野の研究者が細菌の成長促進効果を評価する際に用いる自然環境水の組成に近い貧栄養条件の modified Hoagland 培地と、Sigma 社が販売する Hoagland 培地 No2 (Cat# H2395) の組成は大きく異なるため、文献参照時には混同しないよう注意が必要である。これらの研究は、ウキクサ植物—微生物共生機構の理解にとどまらず、栄養塩類や有機汚染物質の除去など、水質浄化における機能的役割の解析にも応用されている (Ishizawa et al. 2017b; Acosta et al. 2023)。近年では、これらの研究を社会実装へと展開する取り組みとして、国際科学技術協力プログラム (SATREPS) 「タイ国・生物循環グリーン経済実現に向けたウキクサホロビオン資源価値の包括的開拓 (JPMJSA2004)」が進行中である。本プロジェクトではタイ国のカセサート大学やマヒドン大学などと連携し、ウキクサとその共生微生物を基盤とした資源循環型社会の構築を目指している。筆者らのグループも本プロジェクトに参画しており、タイ国におけるウキクサ植物の種の多様性や (Senayai et al. 2025)，ウキクサホロビオンの多様性・機能解析を通じてウキクサ+ホロビオンのバンクを構築し (Bunyoo et al. 2022; Ishizawa et al. 2025)，低炭素型水処理、バイオマス生産、機能性物質利用などの応用研究を推進している (Ooi et al. 2024; Ishizawa et al. 2025)。タイ国では古くからミジンコウキクサ (*Wolffia globosa*) を食用利用しており、その必須アミノ酸含有量はダイズなど従来の植物性タンパク源と比べても高いことが報告されている (Boonarsa et al. 2024)。また、動物性食品に含まれるビタミン B12 を *W. globosa* から摂取できることが近年明らかとなった。*W. globosa* 自身がビタミン B12 を生産している可能性が考えられていたが (Sela et al. 2020)，解析の結果、ウキクサに付着した細菌群が協調的にビタミン B12 を生産していることが明らかとなっている。(Appenroth et al. 2017, 2018)。高品質な食用の *W. globosa* を持続的に大量培養するシステムの構築も、SATREPS プロジェクトの達成目標に含まれている。中国では、水田稲作におけるウキクサの施肥の効率化や雑草防除に関して研究が進められている (Wang et al. 2022, 2023; Xu et al. 2024; Jing et al. 2024)。近年、日本の水田でも持続可能な稲作の有機農法として、ウキクサ *S. polyrhiza* を雑草防除用のリビングマルチとして利用する試みが報告されている。本報告では、ウキクサリビングマルチを単に雑草防除のための物理的なシートとして利用するだけでなく、不耕起栽培、イネの直播きと組み合わせることで、シアノバクテリアの窒素固定に由来する窒素源をウキクサ個体内に一旦吸収させ、イネの出穂期にウキクサを枯死・分解させることで最終的に肥料としてイネに吸収させることで持続可能な収量増大が期待できるとしている。(陶 and 小松崎 2023)

4-5. ウキクサ進化と植物ホルモン応答の理解

ウキクサ植物の極端なサイズ縮小と形態の特殊化は、陸上植物の形態形成過程や器官発達の進化的理解に新たな視点を提供する。ウキクサ植物は水生環境に高度に適応する過程で、祖先型と考えられている *S. polyrhiza* から根の数が減少し、ミジンコウキクサ属 (*Wolffia*) や *Wolffiella* 属では維管束などの主要な組織系も完全に失っている。このような形態的多様性と段階的な器官喪失は、被子植物における根や維管束形成の分子基盤を比較進化学的に解析するのに理想的なモデルである。実際、根の発生や維管束形成に関与する遺伝子群の発現解析から、根を欠く *Wolffia australiana* ではオーキシン輸送およびシグナル伝達経路の主要な構成要素 (auxin efflux carrier PIN 遺伝子群, 転写因子 WOX5, PLT など) の一部が欠失または転写レベルで抑制されていることが明らかとなっている (Michael et al. 2021; Lam and Michael 2022)。さらに、近年の一細胞レベルの発現解析により、ウキクサフロンドにおける細胞型の分化地図が明らかになり、茎頂分裂組織様の領域や表皮・気孔形成細胞の分化経路が明確になりつつある (Denyer et al. 2024)。特に、ウキクサでは他の被子植物とは異なり、気孔がフロンドの向軸側 (上面) に限定して形成されることは古くから知られており、これは浮遊生活への形態的な適応として重要である。この気孔形成様式の分子基盤についても、SPCH や FAMA などの気孔発達制御因子の発現領域や制御ネットワークの比較から、陸上植物とは異なる発達制御機構の存在が示唆されている。また、*Wolffia* 属では、サイトカイニンおよびオーキシンのシグナル伝達系に関与する遺伝子の一部がゲノムレベルで欠失していることが報告されており (Park et al. 2021; Li et al. 2023)、植物ホルモン応答経路の再構築が極端な器官喪失と密接に関連している可能性が指摘されている。これらの知見は、ウキクサ植物が単なる「極小植物」ではなく、植物器官形成の最小限モデル (minimal morphogenetic system known angiosperm) として位置づけられ、陸上植物の器官多様化・適応進化の理解における新たな実験的基盤を提供している。

5. ウキクサ植物遺伝資源の整備と保存の試み

これまで述べてきた通り、研究に用いるウキクサ種の選択は重要であるが、さらに同種内の採取地域の異なる株 (clone) 間に見られる表現型多様性を活用することも重要である。実際、比較的狭い地域で独立に取得された同一種のウキクサであっても環境耐性などに顕著な多様性が現れることが報告されている (Sree et al. 2015; Bog et al. 2022a)。多くのウキクサ種で種子形成が困難で、遺伝学的解析に成約があるものの、自然変異集団由来の多様な株を比較することで、基礎的知見の深化および応用研究の発展が期待できる。現在、各ウキクサ種において国際的に用いられる基準株 (clone) は十分に確立されておらず、ウキクサ研究者コミュニティでは、論文投稿時に使用株の種名、採取地、株名 (clone 名) を明示することを推奨している。また、使用した株の長期的維持も強く推奨されている。

Elias Landolt 博士は数百におよぶウキクサコレクションを構築し、各株に 4 桁の識別番号 (Landolt 番号) を付与した。これらの多くは Rutgers Duckweed Stock Cooperative (RDSC) など複数の国際的機関により維持されており、登録リストも公開されている。近年までは、新規株を用いた研究成果を発表する際、RDSC への登録が国際的に推奨され、登録株には Landolt

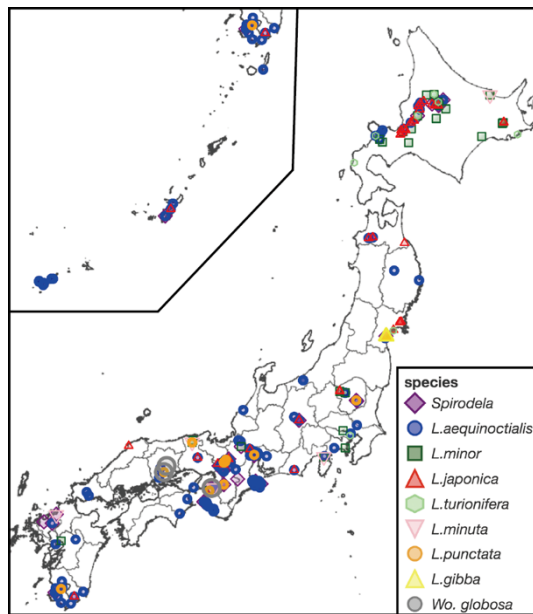


図5. 国内で採取され研修室で維持しているウキクサ植物の地理的分布

コレクションと同様に 4 桁番号が付与されてきた (Landolt 博士は 6000—9000 番台を使用)。近年のウキクサ研究の活性化に伴い、各研究機関においてラベリングシステムを構築し、研究者が自らの責任で株を維持・管理することが求められるようになっている。番号付与の指針については、国際ウキクサ会議 (ICDRA) において議論され、各研究機関 (研究者) を表す 2~3 桁のアルファベット記号と株 (clone) 識別する 3~4 桁の番号を組み合わせた体系が推奨されている。株名を明示せず、種名のみを記載した研究報告では、結果の再現性や比較解析の妥当性が大きく損なわれるため明確な株の記述は不可欠である。

筆者らの研究グループでは Landolt 博士のコレクションを含む国内外のウキクサ植物 5 属

31 種 180 株の野生株に加え、*Lemna minor*, *Le. turionifera*, *Le. japonica* を背景株とする形質転換株約 300 株を無菌条件下で維持している (図 5)。保持している野生株リストは研究室 WEB サイト (http://cosmos.bot.kyoto-u.ac.jp/clock/research/map_duckweed.html) にて公開している。

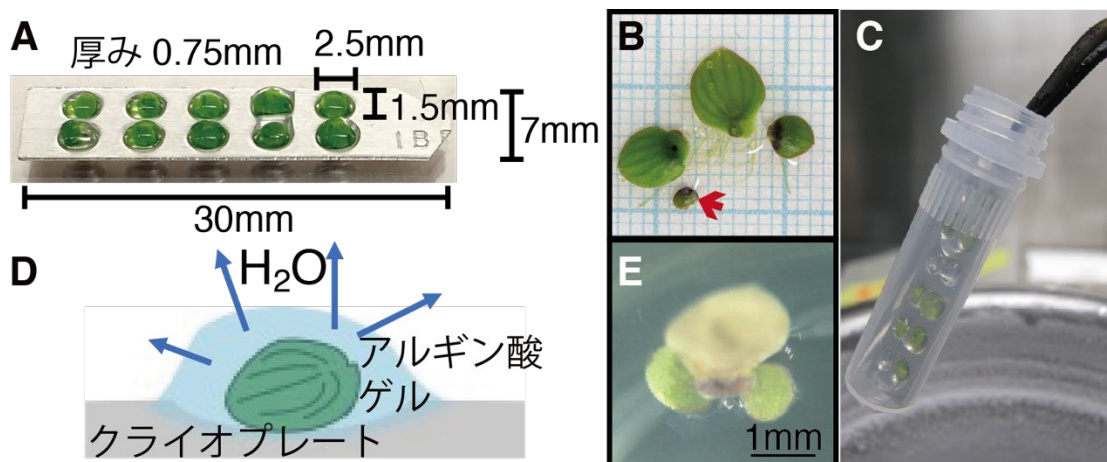


図6. ウキクサ植物のクライオプレートを用いたビーズガラス化凍結保存法

A: アルミニウムクライオプレート上でウキクサフロンドをアルギン酸ビーズに包埋。B: ウキクサ *S. polyrrhiza* のコロニーからクライオプレートの窪みに入る極小サイズの子フロンドを使用する。C: 急速凍結に用いる 2.0mL のクライオチューブ。D: ビーズ包埋後に PVS2 液に浸しビーズ内と植物体内の水分を PVS2 液に置換 (20~40 分間。種に依存) E: 急速解凍後、1%ショ糖入り NF 培地で 4 日間培養した植物極小のフロンドのポケットから子フロンドが復活している。

ウキクサ株の維持は通常、継代培養が用いられるが、液体・寒天培地や生育条件の最適化により継代頻度を低減する工夫が各研究室で行われている。それでもなお、雑菌混入や取り違い、突然変異の発生による形質の変化など、株維持上の課題は残されている。

近年、これらの課題を克服する手法として、液体窒素下でのガラス化低温保存方法の導入が検討されている。Peterson らは 4 属, 8 種 2 雑種 21 株について、アルミホイルと Plant Vitrification Solution 3 (PVS3) (Nishizawa et al. 1993) を用いたウキクサのバルク保存法の成功例を報告している (Peterson et al. 2023)。筆者らのグループも、農研機構の田中大介博士との共同研究により、アルミ製クライオプレートと PVS2 (Sakai et al. 1990) を用いたビーズガラス化法により、ウキクサ科 5 属にわたる複数株の長期保存と再生育に成功している (未発表)。本法では、極小クライオプレートとアルギン酸ビーズ包埋による、フロンドサイズ、ビーズの体積の均一化 (図 6) により、脱水および冷却効率を均一化し、高い再現性を得ている。極小の未熟フロンドの大部分の細胞は復活しないが、分裂組織付近は生存し、再生培地で 1 週間以内に新たな子フロンドが再生する (図 6E)。特に日本に分布する *S. polyrhiza*, *La. punctata*, *Le. minor*, *Le. turionifera*, *Le. japonica* では再生育率がほぼ 100% に達し、*Le. gibba*, *Le. minuta*, *Le. aequinoctialis*, *Wolffia globosa* においても実用レベルの再生が確認されている。さらに、*Le. minor*, *Le. turionifera*, *Le. japonica* を背景とする形質転換株についても長期保存が可能であり、これらは基礎生物学研究所に設置された、「大学連携バイオバックアッププロジェクト (IBBP)」も利用し、安全に保管されている。このような保存技術および貴重な遺伝資源の整備は、基礎・応用研究の持続的発展に資するものであり、今後、新規研究者が安心してウキクサ研究に参入できる基盤となる。

6. モデル植物としての確立への課題

ウキクサ植物を用いた基礎・応用研究において、第 7 回国際ウキクサ会議 (7th ICDRA 2024) では Klaus-J. Appenroth 博士が今後解決すべき 9 つの課題を提起された。同様の議論は、国内のウキクサ研究会においても活発に進められている。最後に、それらの主要な課題について簡潔に触れておきたい。

- 1 : 培養スケールアップの課題。ウキクサは水面付近で 2 次元的に増殖するため、広大な培養池を利用するのか、あるいは安定した多層型の培養システムの構築が必要である。
- 2 : 高タンパク質化 or 高デンプン化。好適条件下では高タンパク質含有量を示す一方、休眠誘導のセクションでも述べたが、ストレス応答でデンプンを多量に蓄積する。同時達成は困難であり、目的に応じた最適な種および株 (clone) の選抜システムが必要である。
- 3 : 種・種内分類の混乱。ゲノム解析や倍数性解析の進展が問題の解決に貢献しているが、種内の株の分類に、簡便で信頼の置けるツールの開発が求められる。
- 4 : 種内多型およびゲノム・エピゲノム比較。ウキクサ *S.p.* 種内の 100 以上の株間のゲノム配列比較が行われたが驚くほど配列の多様性が低かった。一方表現型の多様性、可塑性は高くエピジェネティックな変化がその原因になっていることが考えられる。他の種に関しては種内の株のゲノムサイズ多様性もあり、比較可能な情報がそもそも少ない。
- 5 : 安定形質転換体の安定利用と維持問題。マーカー遺伝子を用いた形質転換成功報告は蓄積しているが、株依存性が高く、その原因も解明されていない。また、実際に形質転換体を用いて基礎研究を進めた例、有用物質生産に実用化した例は少ない。作出した形質転換植物の維持と研究者間の共有方法の整備も必要である。

- 6 : 1 細胞オミクス解析技術。ウキクサの増殖、発達様式の理解のための 1 細胞レベルの遺伝子発現解析も進めていく必要がある。
- 7 : ウキクサホロバイオントの理解と利用。ウキクサ表面（根，フロンド裏・表）に存在する微生物叢との相互作用に関する微生物・ウキクサ双方の知見の蓄積が必要である。
- 8 : 下・排水の処理へのウキクサ利用。排水はウキクサ植物にとっての肥料であり，持続可能な排水処理とウキクサバイオマス生産，エネルギー生産システムの開発が必要である。
- 9 : 人類の新たな栄養資源としてのウキクサ植物。タンパク質含量の増加，消化吸收を妨げる抗栄養成分の特定，収穫や収穫後の輸送・加工技術の開発が必要である。

7. 終わりに

ウキクサ研究は，古典的な植物生理学から分子・生態・応用科学を包括する学際的研究領域へと再興を遂げつつある。本稿で取り上げきれなかったホットな研究分野が数多く存在する。すべての関連研究を網羅的に紹介することはできなかったことについてはご容赦いただきたい。国際的なウキクサ研究をまとめたニュースレターに **Duckweed Forum (DF)** が 1 年に 4 回出版されているので，興味のある読者は是非，**Rutgers Duckweed Stock Cooperative (RDSC)** の WEB サイト (<http://www.rduckweed.org/>) から参照されたい。本稿が，上記の課題に対して基礎・応用の両面から解決に向けて貢献しようとする研究者の増加を促し，ウキクサ植物を新たな研究対象として導入する契機となれば幸いである。

謝辞

筆者はシロイヌナズナを扱う研究者であったが，京都大学に赴任後初めてウキクサ植物を扱うようになった。研究室でウキクサ研究へ導いてくださり，これまで共同で研究を支えてくださった小山時隆博士，村中智明博士及び関係者の皆様に感謝申し上げます。ウキクサ形質転換の成功と研究発展の契機となった *Lemna japonica* 5512 株を分与いただいた北海道大学の森川正章博士には，特に厚く御礼申し上げます。ガラス化凍結保存に関しては農研機構の田中大介博士から技術協力と貴重なご助言を賜った。ここに深く感謝する。また，本稿の内容に関して情報提供と今後の課題についてのご議論・ご助言をくださった **Klaus-J. Appenroth** 博士に深く感謝申し上げます。さらに，シンポジウム「環境ストレスに対する植物の生体応答の柔軟性」を企画され，**BSJ-Review** に寄稿する機会をくださった奈良先端科学技術大学の山口暢俊博士，久保田茜博士，日本植物学会電子出版物編集委員会の皆様に，心より厚く御礼申し上げます。

引用文献

- Abramson BW, Novotny M, Hartwick NT, Colt K, Aeversmann BD, Scheuermann RH, Michael TP (2022) The genome and preliminary single-nuclei transcriptome of *Lemna minuta* reveals mechanisms of invasiveness. *Plant Physiol* 188: 879–897. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiab564>
- Acosta K, Appenroth KJ, Borisjuk L, Edelman M, Heinig U, Jansen MAK, Oyama T, Pasaribu B, Schubert I, Sorrels S, et al (2021) Return of the Lemnaceae: duckweed as a model plant system in the

- genomics and postgenomics era. *The Plant Cell* 33: 3207–3234. <https://doi.org/10.1093/plcell/koab189>
- Acosta K, Sorrels S, Chrisler W, Huang W, Gilbert S, Brinkman T, Michael TP, Lebeis SL, Lam E (2023) Optimization of Molecular Methods for Detecting Duckweed-Associated Bacteria. *Plants* 12: 872. <https://doi.org/10.3390/plants12040872>
- Acosta K, Xu J, Gilbert S, Denison E, Brinkman T, Lebeis S, Lam E (2020) Duckweed hosts a taxonomically similar bacterial assemblage as the terrestrial leaf microbiome. *PLoS ONE* 15: e0228560. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0228560>
- Appenroth K-J (2003) No photoperiodic control of the formation of turions in eight clones of *Spirodela polyrhiza*. *Journal of Plant Physiology* 160: 1329–1334. <https://doi.org/10.1078/0176-1617-01035>
- Appenroth K-J, Augsten H (1991) Photophysiology of turion germination in *Spirodela polyrhiza* (L.) Schleiden IX. Interaction of light and gibberellic acid in the removal of dormancy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 11: 343–351. [https://doi.org/10.1016/1011-1344\(91\)80039-K](https://doi.org/10.1016/1011-1344(91)80039-K)
- Appenroth K-J, Opfermann J, Hertel W, Augsten H (1989) Photophysiology of Turion Germination in *Spirodela polyrhiza* (L.) SCHLEIDEN. II. Influence of After-ripening on Germination Kinetics. *Journal of Plant Physiology* 135: 274–279. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(89\)80118-X](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(89)80118-X)
- Appenroth K-J, Sree KS, Bog M, Ecker J, Seeliger C, Böhm V, Lorkowski S, Sommer K, Vetter W, Tolzin-Banasch K, et al (2018) Nutritional Value of the Duckweed Species of the Genus *Wolffia* (Lemnaceae) as Human Food. *Front Chem* 6: 483. <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00483>
- Appenroth K-J, Sree KS, Böhm V, Hammann S, Vetter W, Leiterer M, Jahreis G (2017) Nutritional value of duckweeds (Lemnaceae) as human food. *Food Chemistry* 217: 266–273. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.08.116>
- Baggs EL, Tiersma MB, Abramson BW, Michael TP, Krasileva KV (2022) Characterization of defense responses against bacterial pathogens in duckweeds lacking EDS1. *New Phytologist* 236: 1838–1855. <https://doi.org/10.1111/nph.18453>
- Balaji P, Satheeshkumar PK, Venkataraman K, Vijayalakshmi MA (2016) Expression of anti-tumor necrosis factor alpha (TNF α) single-chain variable fragment (scFv) in *Spirodela punctata* plants transformed with *Agrobacterium tumefaciens*. *Biotech and App Biochem* 63: 354–361. <https://doi.org/10.1002/bab.1373>
- Bergmann BA, Cheng J, Classen J, Stomp A-M (2000) In vitro selection of duckweed geographical isolates for potential use in swine lagoon effluent renovation. *Bioresource Technology* 73: 13–20. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00137-6](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00137-6)
- Bog M, Appenroth K-J, Schneider P, Sree KS (2022a) Intraspecific Diversity in Aquatic Ecosystems: Comparison between *Spirodela polyrhiza* and *Lemna minor* in Natural Populations of Duckweed. *Plants (Basel)* 11: 968. <https://doi.org/10.3390/plants11070968>
- Bog M, Braglia L, Morello L, Noboa Melo KI, Schubert I, Shchepin ON, Sree KS, Xu S, Lam E, Appenroth KJ (2022b) Strategies for Intraspecific Genotyping of Duckweed: Comparison of Five

- Orthogonal Methods Applied to the Giant Duckweed *Spirodela polyrhiza*. *Plants* 11: 3033. <https://doi.org/10.3390/plants11223033>
- Bog M, Lautenschlager U, Landrock MF, Landolt E, Fuchs J, Sowjanya Sree K, Oberprieler C, Appenroth K-J (2015) Genetic characterization and barcoding of taxa in the genera *Landoltia* and *Spirodela* (Lemnaceae) by three plastidic markers and amplified fragment length polymorphism (AFLP). *Hydrobiologia* 749: 169–182. <https://doi.org/10.1007/s10750-014-2163-3>
- Bog M, Sree KS, Fuchs J, Hoang PTN, Schubert I, Kuever J, Rabenstein A, Paolacci S, Jansen MAK, Appenroth K (2020) A taxonomic revision of *Lemna* sect. *Uninerves* (Lemnaceae). *TAXON* 69: 56–66. <https://doi.org/10.1002/tax.12188>
- Boonarsa P, Bunyatratchata A, Chumroenphat T, Thammapat P, Chaikwang T, Siripan T, Li H, Siriamornpun S (2024) Nutritional Quality, Functional Properties, and Biological Characterization of Watermeal (*Wolffia globosa*). *Horticulturae* 10: 1171. <https://doi.org/10.3390/horticulturae10111171>
- Braglia L, Breviario D, Gianì S, Gavazzi F, De Gregori J, Morello L (2021a) New Insights into Interspecific Hybridization in *Lemna* L. Sect. *Lemna* (Lemnaceae Martinov). *Plants* 10: 2767. <https://doi.org/10.3390/plants10122767>
- Braglia L, Ceschin S, Iannelli MA, Bog M, Fabriani M, Frugis G, Gavazzi F, Gianì S, Mariani F, Muzzi M, et al (2024) Characterization of the cryptic interspecific hybrid *Lemna* × *mediterranea* by an integrated approach provides new insights into duckweed diversity. *Journal of Experimental Botany* 75: 3092–3110. <https://doi.org/10.1093/jxb/erae059>
- Braglia L, Lauria M, Appenroth KJ, Bog M, Breviario D, Grasso A, Gavazzi F, Morello L (2021b) Duckweed Species Genotyping and Interspecific Hybrid Discovery by Tubulin-Based Polymorphism Fingerprinting. *Front Plant Sci* 12: 625670. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.625670>
- Bunyoo C, Roongsattham P, Khumwan S, Phonmakham J, Wonnapijit P, Thamchaipenet A (2022) Dynamic Alteration of Microbial Communities of Duckweeds from Nature to Nutrient-Deficient Condition. *Plants* 11: 2915. <https://doi.org/10.3390/plants11212915>
- Canto-Pastor A, Molla-Morales A, Ernst E, Dahl W, Zhai J, Yan Y, Meyers BC, Shanklin J, Martienssen R (2015a) Efficient transformation and artificial miRNA gene silencing in *Lemna minor*. *Plant Biol (Stuttg)* 17 Suppl 1: 59–65. <https://doi.org/10.1111/plb.12215>
- Canto-Pastor A, Molla-Morales A, Ernst E, Dahl W, Zhai J, Yan Y, Meyers BC, Shanklin J, Martienssen R (2015b) Efficient transformation and artificial miRNA gene silencing in *Lemna minor*. *Plant biology* 17 Suppl 1: 59–65. <https://doi.org/10.1111/plb.12215>
- Chhabra G, Chaudhary D, Sainger M, Jaiwal PK (2011) Genetic transformation of Indian isolate of *Lemna minor* mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and recovery of transgenic plants. *Physiology and molecular biology of plants : an international journal of functional plant biology* 17: 129–36. <https://doi.org/10.1007/s12298-011-0059-5>
- Cleland CF, Briggs WR (1967) Flowering Responses of the Long-day Plant *Lemna gibba* G3. *Plant Physiol* 42: 1553–1561. <https://doi.org/10.1104/pp.42.11.1553>

- Denyer T, Wu P-J, Colt K, Abramson BW, Pang Z, Solansky P, Mamerto A, Nobori T, Ecker JR, Lam E, et al (2024) Streamlined spatial and environmental expression signatures characterize the minimalist duckweed *Wolffia australiana*. *Genome Res* 34: 1106–1120. <https://doi.org/10.1101/gr.279091.124>
- Dombey R, Buendía-Ávila D, Barragán-Borrero V, Diezma-Navas L, Ponce-Mañe A, Vargas-Guerrero JM, Elias R, Mari-Ordóñez A (2025) Atypical epigenetic and small RNA control of degenerated transposons and their fragments in clonally reproducing *Spirodela polyrhiza*. *Genome Res* 35: 522–544. <https://doi.org/10.1101/gr.279532.124>
- Ernst E, Abramson B, Acosta K, Hoang PTN, Mateo-Elizalde C, Schubert V, Pasaribu B, Albert PS, Hartwick N, Colt K, et al (2025) Duckweed genomes and epigenomes underlie triploid hybridization and clonal reproduction. *Current Biology* 35: 1828-1847.e9. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2025.03.013>
- Fang X, Hong Y, Fang Y, Cheng L, Li Z, Li C, Ban X (2025) Transcriptomic and Metabolic Analysis Reveal Potential Mechanism of Starch Accumulation in *Spirodela polyrhiza* Under Nutrient Stress. *Plants* 14: 1617. <https://doi.org/10.3390/plants14111617>
- Fourounjian P, Slovin J, Messing J (2021) Flowering and Seed Production across the Lemnaceae. *IJMS* 22: 2733. <https://doi.org/10.3390/ijms22052733>
- Harkess A, McLoughlin F, Bilkey N, Elliott K, Emenecker R, Mattoon E, Miller K, Czymmek K, Vierstra RD, Meyers BC, et al (2021) Improved *Spirodela polyrhiza* genome and proteomic analyses reveal a conserved chromosomal structure with high abundance of chloroplastic proteins favoring energy production. *Journal of Experimental Botany* 72: 2491–2500. <https://doi.org/10.1093/jxb/erab006>
- Heenatigala PPM, Yang J, Bishopp A, Sun Z, Li G, Kumar S, Hu S, Wu Z, Lin W, Yao L, et al (2018) Development of Efficient Protocols for Stable and Transient Gene Transformation for *Wolffia Globosa* Using *Agrobacterium*. *Front Chem* 6: 227. <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00227>
- Hoang PNT, Michael TP, Gilbert S, Chu P, Motley ST, Appenroth KJ, Schubert I, Lam E (2018) Generating a high-confidence reference genome map of the Greater Duckweed by integration of cytogenomic, optical mapping, and Oxford Nanopore technologies. *The Plant Journal* 96: 670–684. <https://doi.org/10.1111/tpj.14049>
- Hoang PTN, Fiebig A, Novák P, Macas J, Cao HX, Stepanenko A, Chen G, Borisjuk N, Scholz U, Schubert I (2020) Chromosome-scale genome assembly for the duckweed *Spirodela intermedia*, integrating cytogenetic maps, PacBio and Oxford Nanopore libraries. *Sci Rep* 10: 19230. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75728-9>
- Hoang PTN, Schubert V, Meister A, Fuchs J, Schubert I (2019) Variation in genome size, cell and nucleus volume, chromosome number and rDNA loci among duckweeds. *Sci Rep* 9: 3234. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39332-w>

- Horikawa Y, Watanabe E, Ito S, Oyama T (2025) Model-based analysis of the circadian rhythm generation of bioluminescence reporter activity in duckweed. *Plant Biotechnology* 42: 173–177. <https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.24.1226a>
- Ishizawa H, Kuroda M, Morikawa M, Ike M (2017a) Differential oxidative and antioxidative response of duckweed *Lemna minor* toward plant growth promoting/inhibiting bacteria. *Plant Physiology and Biochemistry* 118: 667–673. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.08.006>
- Ishizawa H, Kuroda M, Morikawa M, Ike M (2017b) Evaluation of environmental bacterial communities as a factor affecting the growth of duckweed *Lemna minor*. *Biotechnol Biofuels* 10: 62. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0746-8>
- Ishizawa H, Saimee Y, Sugiyama T, Kojima T, Inoue D, Ike M, Thamchaipenet A, Morikawa M (2025) Duckweed as an Emerging Model System for Plant–Microbiome Interactions. *Environmental Microbiology* 27: e70181. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.70181>
- Ishizawa H, Tada M, Kuroda M, Inoue D, Futamata H, Ike M (2020) Synthetic Bacterial Community of Duckweed: A Simple and Stable System to Study Plant-microbe Interactions. *Microb Environ* 35: n/a. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME20112>
- Isoda M, Ito S, Oyama T (2022) Interspecific divergence of circadian properties in duckweed plants. *Plant Cell & Environment* 45: 1942–1953. <https://doi.org/10.1111/pce.14297>
- Isoda M, Oyama T (2018) Use of a duckweed species, *Wolffiella hyalina*, for whole-plant observation of physiological behavior at the single-cell level. *Plant Biotechnology* 35: 387–391. <https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.18.0721a>
- Ito-Miwa K, Serikawa M, Kondo T, Oyama T (2014) Overexpression of a *CO* homologue disrupts the rhythmic expression of clock gene *LgLHY1* in *Lemna gibba*. *Plant Biotechnology* 31: 319–328. <https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.14.1111a>
- Jing L, Wang X, Zhao Y, Li F, Su Y, Cai Y, Zhao F, Dong G, Yang L, Wang Y (2024) Impact of Duckweed (*Lemna minor* L.) Growing in Paddy Fields on Rice Yield and Its Underlying Causes. *Agronomy* 14: 726. <https://doi.org/10.3390/agronomy14040726>
- Khvatkov P, Firsov A, Shvedova A, Kozlov O, Chernobrovkina M, Pushin A, Shaloiko L, Dolgov S (2021) *Wolffia arrhiza* as a promising producer of recombinant hirudin. *3 Biotech* 11: 209. <https://doi.org/10.1007/s13205-021-02762-3>
- Khvatkov P, Firsov A, Shvedova A, Shaloiko L, Kozlov O, Chernobrovkina M, Pushin A, Tarasenko I, Chaban I, Dolgov S (2018) Development of *Wolffia arrhiza* as a Producer for Recombinant Human Granulocyte Colony-Stimulating Factor. *Front Chem* 6: 304. <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00304>
- Ko S-M, Sun H-J, Oh MJ, Song I-J, Kim M-J, Sin H-S, Goh C-H, Kim Y-W, Lim P-O, Lee H-Y (2011a) Expression of the protective antigen for PEDV in transgenic duckweed, *Lemna minor*. *Horticulture, Environment, and Biotechnology* 52: 511

- Ko S-M, Sun H-J, Oh MJ, Song I-J, Kim M-J, Sin H-S, Goh C-H, Kim Y-W, Lim P-O, Lee H-Y, et al (2011b) Expression of the protective antigen for PEDV in transgenic duckweed, *Lemna minor*. *Hortic Environ Biotechnol* 52: 511. <https://doi.org/10.1007/s13580-011-0007-x>
- Kozlov ON, Mitiouchkina TYu, Tarasenko IV, Shaloiko LA, Firsov AP, Dolgov SV (2019) Agrobacterium-Mediated Transformation of *Lemna minor* L. with Hirudin and β -Glucuronidase Genes. *Appl Biochem Microbiol* 55: 805–815. <https://doi.org/10.1134/S0003683819080076>
- Kubota A, Ishizaki K, Hosaka M, Kohchi T (2013) Efficient Agrobacterium-mediated transformation of the liverwort *Marchantia polymorpha* using regenerating thalli. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 77: 167–72. <https://doi.org/10.1271/bbb.120700>
- Lam E, Michael TP (2022) *Wolffia*, a minimalist plant and synthetic biology chassis. *Trends in Plant Science* 27: 430–439. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2021.11.014>
- Landolt E, Kandeler R (1987) Biosystematic investigations in the family of duckweeds (“Lemnaceae”). Vol. 4: The family of “Lemnaceae”: a monographic study. Volume 2. <https://doi.org/10.5169/SEALS-308870>
- Lee Y, Kato S, Kim JY, Shimono Y, Shiga T (2024) Two lineages of *Lemna aequinoctialis* (Araceae, Lemnoideae) based on physiology, morphology, and phylogeny. *J Plant Res* 137: 359–376. <https://doi.org/10.1007/s10265-023-01509-w>
- Li F, Yang J-J, Sun Z-Y, Wang L, Qi L-Y, A S, Liu Y-Q, Zhang H-M, Dang L-F, Wang S-J, et al (2023) Plant-on-chip: Core morphogenesis processes in the tiny plant *Wolffia australiana*. *PNAS Nexus* 2: pgad141. <https://doi.org/10.1093/pnasnexus/pgad141>
- Liang Y, Yu X, Anaokar S, Shi H, Dahl WB, Cai Y, Luo G, Chai J, Cai Y, Mollá-Morales A, et al (2023) Engineering triacylglycerol accumulation in duckweed (*Lemna japonica*). *Plant Biotechnology Journal* 21: 317–330. <https://doi.org/10.1111/pbi.13943>
- Liu Y, Wang Y, Xu S, Tang X, Zhao J, Yu C, He G, Xu H, Wang S, Tang Y, et al (2019) Efficient genetic transformation and CRISPR /Cas9-mediated genome editing in *Lemna aequinoctialis*. *Plant Biotechnology Journal* 17: 2143–2152. <https://doi.org/10.1111/pbi.13128>
- Makino A, Nakai R, Yoneda Y, Toyama T, Tanaka Y, Meng X-Y, Mori K, Ike M, Morikawa M, Kamagata Y, et al (2022) Isolation of Aquatic Plant Growth-Promoting Bacteria for the Floating Plant Duckweed (*Lemna minor*). *Microorganisms* 10: 1564. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10081564>
- Mateo-Elizalde C, Lynn J, Ernst E, Martienssen R (2023) Duckweeds. *Current Biology* 33: R89–R91. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2022.12.036>
- Michael TP, Bryant D, Gutierrez R, Borisjuk N, Chu P, Zhang H, Xia J, Zhou J, Peng H, El Baidouri M, et al (2017) Comprehensive definition of genome features in *Spirodela polyrrhiza* by high-depth physical mapping and short-read DNA sequencing strategies. *The Plant Journal* 89: 617–635. <https://doi.org/10.1111/tpj.13400>
- Michael TP, Ernst E, Hartwick N, Chu P, Bryant D, Gilbert S, Ortleb S, Baggs EL, Sree KS, Appenroth KJ, et al (2021) Genome and time-of-day transcriptome of *Wolffia australiana* link morphological

- minimization with gene loss and less growth control. *Genome Res* 31: 225–238. <https://doi.org/10.1101/gr.266429.120>
- Muranaka T, Ito S, Kudoh H, Oyama T (2022) Circadian-period variation underlies the local adaptation of photoperiodism in the short-day plant *Lemna aequinoctialis*. *iScience* 25: 104634. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.104634>
- Muranaka T, Kubota S, Oyama T (2013) A single-cell bioluminescence imaging system for monitoring cellular gene expression in a plant body. *Plant and Cell Physiology* 54: 2085–2093
- Muranaka T, Okada M, Yomo J, Kubota S, Oyama T (2015) Characterisation of circadian rhythms of various duckweeds. *Plant biology* 17 Suppl 1: 66–74. <https://doi.org/10.1111/plb.12202>
- Muranaka T, Oyama T (2018) Monitoring circadian rhythms of individual cells in plants. *J Plant Res* 131: 15–21. <https://doi.org/10.1007/s10265-017-1001-x>
- Muranaka T, Oyama T (2020) Application of Single-Cell Bioluminescent Imaging to Monitor Circadian Rhythms of Individual Plant Cells. In: Ripp S (ed) *Bioluminescent Imaging*. Springer US, New York, NY, pp 231–242
- Muranaka T, Oyama T (2016) Heterogeneity of cellular circadian clocks in intact plants and its correction under light-dark cycles. *Sci Adv* 2: e1600500. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1600500>
- Nishizawa S, Sakai A, Amano Y, Matsuzawa T (1993) Cryopreservation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) embryogenic suspension cells and subsequent plant regeneration by vitrification. *Plant Science* 91: 67–73. [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(93\)90189-7](https://doi.org/10.1016/0168-9452(93)90189-7)
- Okada M, Muranaka T, Ito S, Oyama T (2017) Synchrony of plant cellular circadian clocks with heterogeneous properties under light/dark cycles. *Sci Rep* 7: 317. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00454-8>
- Ooi T, Sato R, Matsumoto K (2024) Utilization of duckweed-derived biomass for polyhydroxybutyrate production in *Escherichia coli* via dual enzymatic saccharification using amylase and cellulase complex. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 88: 1496–1499. <https://doi.org/10.1093/bbb/zbae127>
- Park H, Park JH, Lee Y, Woo DU, Jeon HH, Sung YW, Shim S, Kim SH, Lee KO, Kim J-Y, et al (2021) Genome of the world's smallest flowering plant, *Wolffia australiana*, helps explain its specialized physiology and unique morphology. *Commun Biol* 4: 900. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02422-5>
- Peterson A, Kishchenko O, Kuhlmann M, Tschiersch H, Fuchs J, Tikhenko N, Schubert I, Nagel M (2023) Cryopreservation of Duckweed Genetic Diversity as Model for Long-Term Preservation of Aquatic Flowering Plants. *Plants* 12: 3302. <https://doi.org/10.3390/plants12183302>
- Rival S, Wisniewski J-P, Langlais A, Kaplan H, Freyssinet G, Vancanneyt G, Vunsh R, Perl A, Edelman M (2008) *Spirodela* (duckweed) as an alternative production system for pharmaceuticals: a case study, aprotinin. *Transgenic Res* 17: 503–513. <https://doi.org/10.1007/s11248-007-9123-x>
- Romano LE, Braglia L, Iannelli MA, Lee Y, Giani S, Gavazzi F, Morello L (2025) A survey of duckweed species in Southern Italy provided first distribution records of the hybrid *Lemna* ×

- mediterranea in nature. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 67: 125863. <https://doi.org/10.1016/j.ppees.2025.125863>
- Sakai A, Kobayashi S, Oiyama I (1990) Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. *Plant Cell Reports* 9. <https://doi.org/10.1007/BF00232130>
- Schmid MW, Moradi A, Leigh DM, Schuman MC, Van Moorsel SJ (2024) Covering the bases: Population genomic structure of *Lemna minor* and the cryptic species *L. japonica* in Switzerland. *Ecology and Evolution* 14: e11599. <https://doi.org/10.1002/ece3.11599>
- Sela I, Yaskolka Meir A, Brandis A, Krajmalnik-Brown R, Zeibich L, Chang D, Dirks B, Tsaban G, Kaplan A, Rinott E, et al (2020) *Wolffia globosa*-Mankai Plant-Based Protein Contains Bioactive Vitamin B12 and Is Well Absorbed in Humans. *Nutrients* 12: 3067. <https://doi.org/10.3390/nu12103067>
- Senayai A, Harnvanichvech Y, Vajrodaya S, Oyama T, Kraichak E (2025) Genetic and Morphological Variation Among Populations of Duckweed Species in Thailand. *Plants* 14: 2030. <https://doi.org/10.3390/plants14132030>
- Serikawa M, Miwa K, Kondo T, Oyama T (2008) Functional Conservation of Clock-Related Genes in Flowering Plants: Overexpression and RNA Interference Analyses of the Circadian Rhythm in the Monocotyledon *Lemna gibba*. *Plant Physiology* 146: 1952–1963. <https://doi.org/10.1104/pp.107.114611>
- Shvedova AN, Khvatkov PA, Dolgov SV (2023) Optimization of Factors Affecting the Efficiency of Agrobacterium-Mediated Transformation of *Wolffia arrhiza*. *Appl Biochem Microbiol* 59: 1177–1182. <https://doi.org/10.1134/S0003683823090089>
- Sree KS, Sudakaran S, Appenroth K-J (2015) How fast can angiosperms grow? Species and clonal diversity of growth rates in the genus *Wolffia* (Lemnaceae). *Acta Physiol Plant* 37: 204. <https://doi.org/10.1007/s11738-015-1951-3>
- Stepanenko A, Braglia L, Fuchs J, Schubert V, Hoang PTN, Lee Y, Chen G, Giani S, Morello L, Schubert I (2025) Genome diversity and evolution of the duckweed section *Alatae* comprising diploids, polyploids, and interspecific hybrids. *Plant J* 122: e70158. <https://doi.org/10.1111/tpj.70158>
- Sun Y, Cheng JJ, Himmel ME, Skory CD, Adney WS, Thomas SR, Tisserat B, Nishimura Y, Yamamoto YT (2007) Expression and characterization of *Acidothermus cellulolyticus* E1 endoglucanase in transgenic duckweed *Lemna minor* 8627. *Bioresource technology* 98: 2866–2872
- Suzuki W, Sugawara M, Miwa K, Morikawa M (2014) Plant growth-promoting bacterium *Acinetobacter calcoaceticus* P23 increases the chlorophyll content of the monocot *Lemna minor* (duckweed) and the dicot *Lactuca sativa* (lettuce). *Journal of Bioscience and Bioengineering* 118: 41–44. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.12.007>
- Toyama T, Kuroda M, Ogata Y, Hachiya Y, Quach A, Tokura K, Tanaka Y, Mori K, Morikawa M, Ike M (2017) Enhanced biomass production of duckweeds by inoculating a plant growth-promoting

- bacterium, *Acinetobacter calcoaceticus* P23, in sterile medium and non-sterile environmental waters. *Water Science and Technology* 76: 1418–1428. <https://doi.org/10.2166/wst.2017.296>
- Ueno K, Ito S, Oyama T (2022) An endogenous basis for synchronisation characteristics of the circadian rhythm in proliferating *Lemna minor* plants. *New Phytologist* 233: 2203–2215. <https://doi.org/10.1111/nph.17925>
- Van Hoeck A, Horemans N, Monsieurs P, Cao HX, Vandenhove H, Blust R (2015) The first draft genome of the aquatic model plant *Lemna minor* opens the route for future stress physiology research and biotechnological applications. *Biotechnol Biofuels* 8: 188. <https://doi.org/10.1186/s13068-015-0381-1>
- Volkova PA, Nachatoi VA, Bobrov AA (2023) Hybrid between *Lemna minor* and *L. turionifera* (*L. × japonica*, Lemnaceae) in East Europe is more frequent than parental species and poorly distinguishable from them. *Aquatic Botany* 184: 103593. <https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2022.103593>
- Vunsh R, Heinig U, Malitsky S, Aharoni A, Avidov A, Lerner A, Edelman M (2015) Manipulating duckweed through genome duplication. *Plant Biol J* 17: 115–119. <https://doi.org/10.1111/plb.12212>
- Vunsh R, Li J, Hanania U, Edelman M, Flaishman M, Perl A, Wisniewski J-P, Freyssinet G (2007) High expression of transgene protein in *Spirodela*. *Plant Cell Rep* 26: 1511–1519. <https://doi.org/10.1007/s00299-007-0361-4>
- Wang F, Wang S, Xu S, Shen J, Cao L, Sha Z, Chu Q (2022) A non-chemical weed control strategy, introducing duckweed into the paddy field. *Pest Management Science* 78: 3654–3663. <https://doi.org/10.1002/ps.7008>
- Wang K-T, Hong M-C, Wu Y-S, Wu T-M (2021) *Agrobacterium*-Mediated Genetic Transformation of Taiwanese Isolates of *Lemna aequinoctialis*. *Plants* 10: 1576. <https://doi.org/10.3390/plants10081576>
- Wang W, Haberer G, Gundlach H, Gläßer C, Nussbaumer T, Luo MC, Lomsadze A, Borodovsky M, Kerstetter RA, Shanklin J, et al (2014) The *Spirodela polyrhiza* genome reveals insights into its neotenus reduction fast growth and aquatic lifestyle. *Nat Commun* 5: 3311. <https://doi.org/10.1038/ncomms4311>
- Wang W, Kerstetter RA, Michael TP (2011) Evolution of Genome Size in Duckweeds (*Lemnaceae*). *Journal of Botany* 2011: 1–9. <https://doi.org/10.1155/2011/570319>
- Wang W, Messing J (2012) Analysis of ADP-glucose pyrophosphorylase expression during turion formation induced by abscisic acid in *Spirodela polyrhiza* (greater duckweed). *BMC Plant Biol* 12: 5. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-12-5>
- Wang Y, Chen X, Guo B, Liu C, Liu J, Qiu G, Fu Q, Li H (2023) Alleviation of aqueous nitrogen loss from paddy fields by growth and decomposition of duckweed (*Lemna minor* L.) after fertilization. *Chemosphere* 311: 137073. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.137073>
- Wang Y, Duchon P, Chávez A, Sree KS, Appenroth KJ, Zhao H, Höfer M, Huber M, Xu S (2024) Population genomics and epigenomics of *Spirodela polyrhiza* provide insights into the evolution of facultative asexuality. *Commun Biol* 7: 581. <https://doi.org/10.1038/s42003-024-06266-7>

- Watanabe E, Isoda M, Muranaka T, Ito S, Oyama T (2021) Detection of Uncoupled Circadian Rhythms in Individual Cells of *Lemna minor* using a Dual-Color Bioluminescence Monitoring System. *Plant and Cell Physiology* 62: 815–826. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcab037>
- Watanabe E, Muranaka T, Nakamura S, Isoda M, Horikawa Y, Aiso T, Ito S, Oyama T (2023) A non-cell-autonomous circadian rhythm of bioluminescence reporter activities in individual duckweed cells. *Plant Physiology* 193: 677–688. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiad218>
- Xu S, Wang F, Ding Y, Liu W, Lan Y, Jia Q, Sun P, Sha Z (2024) An Ecological Weed Control Strategy in Paddy Fields: Light Interception from Duckweed Mulching. *Agronomy* 14: 670. <https://doi.org/10.3390/agronomy14040670>
- Yamamoto YT, Rajbhandari N, Lin X, Bergmann BA, Nishimura Y, Stomp A-M (2001) Genetic transformation of duckweed *Lemna gibba* and *Lemna minor*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 37: 349–353
- Yang GL, Fang Y, Xu YL, Tan L, Li Q, Liu Y, Lai F, Jin YL, Du AP, He KZ, et al (2018a) Frond transformation system mediated by *Agrobacterium tumefaciens* for *Lemna minor*. *Plant molecular biology* 98: 319–331. <https://doi.org/10.1007/s11103-018-0778-x>
- Yang J, Li G, Hu S, Bishopp A, Heenatigala PPM, Kumar S, Duan P, Yao L, Hou H (2018b) A protocol for efficient callus induction and stable transformation of *Spirodela polyrhiza* (L.) Schleiden using *Agrobacterium tumefaciens*. *Aquatic Botany* 151: 80–86. <https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2018.08.004>
- Yang J, Zhao X, Li G, Hu S, Hou H (2021) Frond architecture of the rootless duckweed *Wolffia globosa*. *BMC Plant Biol* 21: 387. <https://doi.org/10.1186/s12870-021-03165-5>
- Yang L, Han Y, Wu D, Yong W, Liu M, Wang S, Liu W, Lu M, Wei Y, Sun J (2017) Salt and cadmium stress tolerance caused by overexpression of the Glycine Max Na⁺/H⁺ Antiporter (GmNHX1) gene in duckweed (*Lemna turionifera* 5511). *Aquatic Toxicology* 192: 127–135
- Yoshida A, Taoka K, Hosaka A, Tanaka K, Kobayashi H, Muranaka T, Toyooka K, Oyama T, Tsuji H (2021) Characterization of Frond and Flower Development and Identification of FT and FD Genes From Duckweed *Lemna aequinoctialis* Nd. *Front Plant Sci* 12: 697206. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.697206>
- Ziegler P (2024) The Developmental Cycle of *Spirodela polyrhiza* Turions: A Model for Turion-Based Duckweed Overwintering? *Plants (Basel)* 13: 2993. <https://doi.org/10.3390/plants13212993>
- 別府敏夫, 柳瀬大輔, 野淵正, 村田源 (1985) 日本産アオウキクサ類の再検討
- 吉田明希子 (2023) ウキクサの繁殖メカニズムとその農学的応用. *BSJ Review* 14: 87–99. <https://doi.org/10.24480/bsj-review.14b5.00246>
- 村中智明 (2023) アオウキクサの花成から考える 光周性の局所適応と概日時計周期の関係. *BSJ Review* 14: 132–142. <https://doi.org/10.24480/bsj-review.14c4.00251>
- 陶武利, 小松崎将一 (2023) 水稻有機栽培におけるウキクサのリビングマルチ利用

亜高山帯に分布する常緑針葉樹の越冬戦略

種子田 春彦¹, 小笠 真由美², 矢崎 健一³, 丸田 恵美子⁴

¹ 東京大学 大学院理学系研究科附属植物園 日光分園
〒321-1435 栃木県日光市花石町 1842

² 国立研究開発法人森林研究・整備機構 森林総合研究所 関西支所
〒612-0855 京都府京都市伏見区桃山町永井久太郎 68

³ 国立研究開発法人森林研究・整備機構 森林総合研究所 北海道支所
〒062-8516 北海道札幌市豊平区羊ヶ丘 7

⁴ 神奈川大学総合理学研究所
〒221-8686 横浜市神奈川区六角橋 3-27-1

Winter survival of evergreen conifers in subalpine climate

Haruhiko Taneda¹, Mayumi Y. Ogasa², Kenichi Yazaki³, Emiko Maruta⁴

¹ Nikko Botanical Gardens, Graduate school of Science, The University of Tokyo,
1842 Hanaishicho, Nikko, Tochigi, 321-1435 Japan

² Kansai Research Center, Forestry and Forest Products Research Institute
68 Nagaikyutaroh, Momoyamachoh, Fushimi, Kyoto, Kyoto, 612-0855 Japan

³ Hokkaido Research Center, Forestry and Forest Products Research Institute
7 Hitsujigaoka, Toyohira, Sapporo, Hokkaido, 062-8516 JAPAN

⁴ Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University
3-27-1 Rokkakubashi, Kanagawa, Yokohama, Kanagawa 221-8686, Japan

Keywords: dieback, pit aspiration, plant hydraulics, tracheids, xylem embolism

DOI: 10.24484/bsj-review.16c4.00288

1. はじめに

植生帯でいう亜高山帯は常緑針葉樹が優占する森林が成立する場所で（図 1A），日本の本州では標高が 1500 m から 2500 m の地域にあたる。亜高山帯の気象条件は植物の成長にとって非常に厳しい。高標高ゆえに気温は低く，十分に光合成ができる期間は 1 年のうち半分にも満たず，逆に寒い冬の期間は長い。亜高山帯に限らず，寒冷地に分布する植物の多くは，地上部を枯らす，雪に埋もれる，落葉する，などの冬の厳しさを回避する戦略をとってやり過ごす（酒井 1995）。一方で，常緑針葉樹は一年中，樹冠に葉を維持し続ける。このため，葉や枝は−20℃を下回るような気温に曝されるし，卓越風が吹き付け，そこに雪が積もっていればさらに大きな力学的な負荷を受ける。気温が低いと酵素反応で動く代謝経路は働きが鈍っている中で，クロロフィルで吸収した光エネルギーを安全に処理しなければならない（Demmig-Adams and Adams 2006）。また，土壌や枝の中の水が凍るので，葉の表面から少しずつ蒸発して失われる水分を補給することができず，冬が長いほど強い乾燥ストレスの状態

に陥る (Mayr et al. 2012)。亜高山帯より高い標高には高木が分布できない高山帯が広がっており、これらの冬のストレスに真っ向から立ち向かって生きている亜高山帯の常緑針葉樹は、最も厳しい環境に生きる樹木であるといえるだろう (Chang et al. 2021)。

私たちは、その亜高山帯でも特に厳しい気象条件である、高山帯との境界の森林限界に生きる常緑針葉樹に興味を持った。ここは強い風が吹き付ける風衝環境であり、枯死して白骨化した個体とともに風下側だけに枝を発達させる旗型樹形を示す個体 (図 1B) がみられるように、常緑針葉樹が分布の最前線で攻防を行っている姿がある。私たちの調査地は亜高山帯の標高約 2250 m にあり森林限界ではないが峠周辺には風衝環境が広がっている。冬の期間も長く、紅葉が始まる 10 月上旬くらいから氷点下の最低気温を記録するようになり、11 月中旬から下旬には根雪となって土壤凍結が始まる。その後、12 月下旬から 2 月上旬までは昼間も 0°C を超えない真冬日が続き、2 月中旬以降、太陽高度の上昇とともに気温は上がっていくが、地面は雪に覆われている。4 月くらいから降雨がはじまり雪解けが促進され、5 月中旬になってやっと陽の光の届きにくい林床からも雪が消える。本稿では、こうした亜高山帯の風衝環境に分布する常緑針葉樹のシラビソ (*Abies veitchii*

Lind.) の、長く厳しい冬を生き延びるための越冬戦略について、私たちがここ数年、本州の八ヶ岳北部の縞枯山・雨池峠での調査を通して得た知見をまとめる (Ogasa et al. 2019; Maruta et al. 2022; Taneda et al. 2021, 2022)。

2. 亜高山帯の環境ストレスと植物への影響

2-1. 風衝環境と冬の乾燥ストレス

冬の間、常緑針葉樹は様々なストレスに耐えないといけないが、風衝地に生育する個体にとっては、冬の乾燥ストレス (frost drought) への応答が越冬の鍵になる (Mayr et al. 2012)。乾燥ストレスのかかり方は、葉の表面から蒸発して水蒸気として出ていく水の速度 (蒸散速度) と土壌から吸収し根や枝を通して葉へ輸送される水の供給速度のバランスで決まる。蒸散で出ていく水の速度は、葉内と大気の水蒸気濃度の差である大気飽差と、葉内から大気へ水蒸気が移動する経路 (気孔や組織表面を覆うクチクラ) での移動しやすさを示す気孔コン

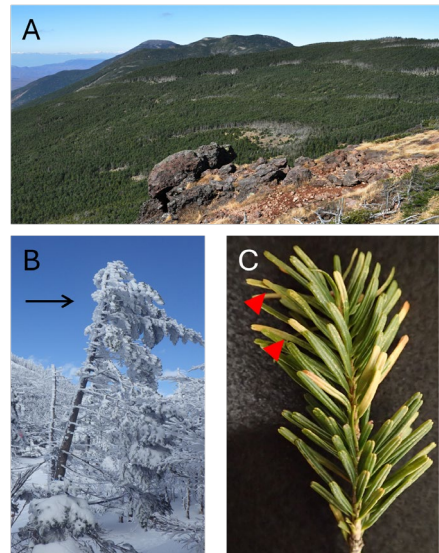


図 1. 亜高山帯針葉樹と風衝環境の個体の様子

A 縞枯山の南西斜面を覆う常緑針葉樹林。斜面を横切る白い帯状の構造は縞枯れ現象、B 旗型樹形の個体。矢印は風上側、C 旗型樹形の樹冠のシュート。矢頭は傷がついて褐変している部位を表す。

ダクタンスやクチクラコンダクタンスとの積で表される。冬の初めに地面が雪で閉ざされるころには気孔が閉鎖し、光合成によるガス交換も観測されなくなる (Bowling et al. 2018)。このため植物体から出ていく主要な水の移動経路は表面のクチクラだけになるが、クチクラコンダクタンスは気孔コンダクタンスの 1/100 程度でしかない (Nakamoto et al. 2012)。気温が低いことで大気飽差も低下し、冬の間の蒸散量は非常に少なくなる。このため、通常的环境中では、長い冬の間に葉への水の輸送が止まっても、乾燥ストレスが生存に影響するような深刻なレベルまで悪化することはほとんどない (Maruta et al. 2020)。

ところが、今回、注目する風衝環境では状況が変わる。風衝地に生える個体の葉では風上側の枝をみると、葉の背軸側に発達する白い帯状のワックスが剥がれている様子や、表皮組織が壊れて褐変した傷痕がみられる (図 1C)。これらは、冬の強い風によって枝が大きく揺られて葉が他の枝葉とこすれあったり、強風で舞い上がった雪や氷の粒が葉へたたきつけられたりすることで起きたと推測されているが、こうした針葉でクチクラコンダクタンスを測定すると、無傷の針葉の数倍の値を示し、蒸散しやすくなっている (Hadley and Smith 1986; Maruta et al. 2020)。通常、針葉の表面はワックスやクチクラといった疎水性の高い物質に覆われていて内部から水が出ていきにくい構造をもつ。葉が傷ついて葉肉組織がむき出しになると防御応答としてリグニンのような疎水性の高い物質が傷口に沈着する (図 2)。しかし、クチクラコンダクタンスの増加はこうした応答があっても十分に蒸散をふせぎきれていないことを意味する。

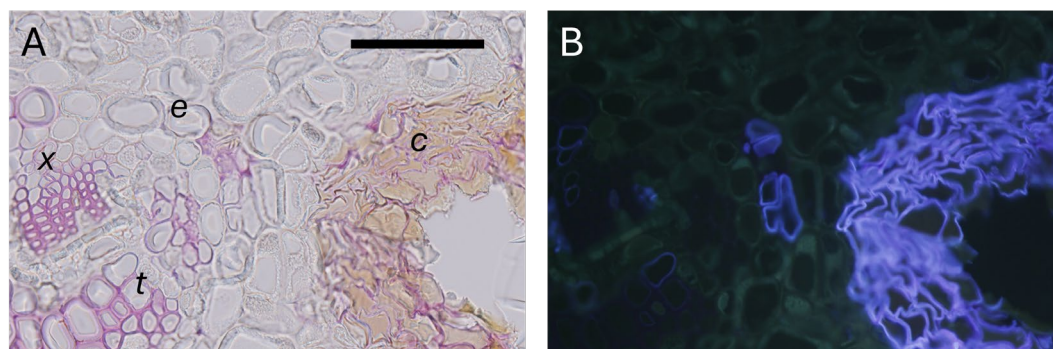


図 2. 葉の褐変箇所の横断面

A フロログルシノール塩酸溶液で染色した。赤く染まった部位 (木部の仮道管 (x) や移入組織仮道管 (t), 内皮 (e) と傷害部位 (c)) でリグニンの沈着が確認された。B 褐変した箇所や移入組織の蛍光 (UV 励起) から疎水性の物質の沈着が推測された。スケールバーは、200 μm 。

水を失いやすい傷ついた葉をもった枝では、冬の間に水収支が徐々に悪化していく。そして、冬の終わりには強い乾燥ストレスに陥り、枝の水の通り道である木部を構成する仮道管を気体が塞いで水の輸送が阻害される「エンボリズム」という現象が起きることが知られている (Mayr et al. 2006)。冬の間に葉への水の供給を阻んでいた土壌や枝の凍結は気温が上

れば回復する。しかし、エンボリズムによる影響は大気飽差が上昇する春以降も続く可能性があり、その場合には常緑針葉樹の成長や生存を脅かすはずである。実際に、常緑広葉樹では凍結融解によるエンボリズムが葉や枝の枯死につながり、種の分布域の決定要因になりうる強い影響を与える (Taneda and Tateno 2005)。

2-2. 植物の水輸送とエンボリズム

エンボリズムの原因となる仮道管に気体が入る経路には大きく 2 つがある (Tyree and Zimmermann 2002)。一つは乾燥ストレスが強くなったときに、既に気体で満たされた仮道管から他の仮道管に気泡が侵入するものであり (乾燥によるエンボリズム)、もう一つは、仮道管内の水が凍結したときに、それまで水に溶けていた気体が気泡として出現するものである (凍結融解によるエンボリズム)。これらを理解するには植物の水輸送に関して少し詳しい知識が必要になるため、やや長くなるが、以下、順を追って説明する。

常緑針葉樹では、植物体のほとんどの距離で維管束の仮道管 (図 3A) を通って水が移動する。針葉樹の仮道管は、直径が $5\text{--}30\text{ }\mu\text{m}$ で長さが $1\text{--}5\text{ mm}$ の細長い死んだ細胞で、中空になった内腔を水が通る (図 3B)。仮道管の細胞壁は、一次細胞壁の内側にリグニンの沈着した二次細胞壁が肥厚し、水漏れを防ぐとともに水が輸送されるときにかかる強い負の圧力に耐

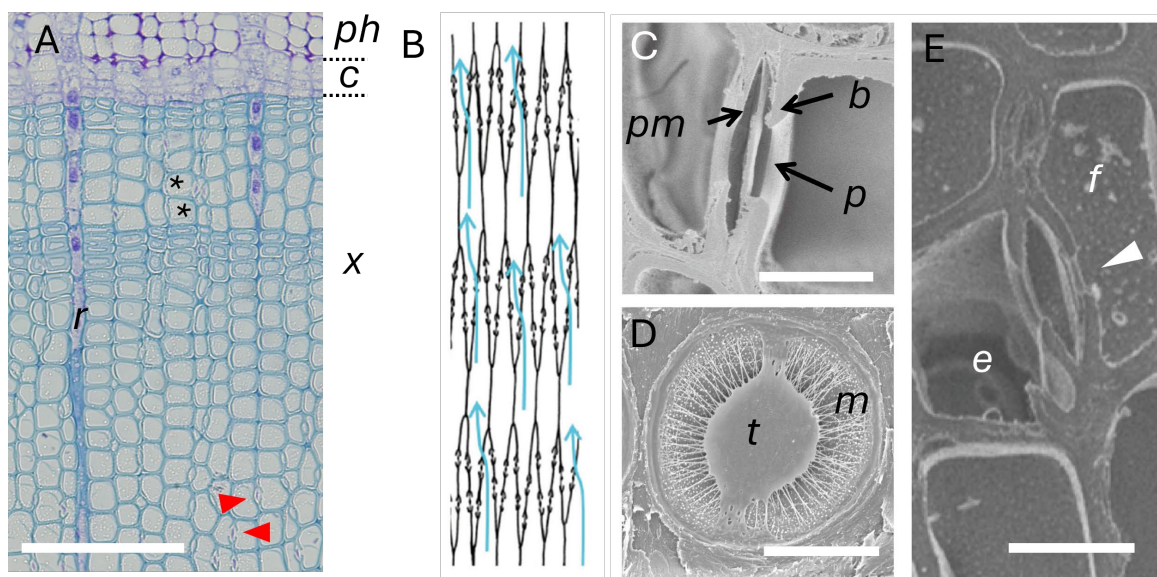


図 3. 針葉樹 (シラビソ) の枝の形態

A 枝の横断面。*ph* は師部、*c* は形成層、*x* は木部、*r* は放射組織を示し、アスタリスクは仮道管の細胞の例を、赤い矢頭は壁孔の例。B 仮道管で構成された木部での軸方向の水の動き、C 壁孔の縦断面。*b* は有縁部、*p* は壁孔口、*pm* は壁孔壁、D 壁孔壁の横断面。壁孔壁の中央部の *t* はトールス、周縁部の *m* はマルゴを示す。E エンボリズムの起きた仮道管で (*e*) と水のある仮道管 (*f*) との境界にある壁孔では、壁孔壁が変形してトールスが壁孔口を塞いでいる (矢じり)。仮道管の内腔部で軸方向に、隣接している仮道管へは壁孔を通して水が移動する。スケールバーは、A では $300\text{ }\mu\text{m}$ 、C と D では $5\text{ }\mu\text{m}$ 、E では $10\text{ }\mu\text{m}$ を示す。

えられるようになっている。仮道管の側面のところどころに二次細胞壁が発達しない壁孔と呼ばれる環状の構造があり、ここで隣の仮道管と連絡している。壁孔は、仮道管内腔側の入り口（壁孔口）に向かって狭まった有縁部という構造がある。内側には一次細胞壁由来の壁孔壁があり、隣接する2つの仮道管を隔てている（図 3C）。針葉樹の壁孔壁は特殊なかたちをしている（図 3D, Jacobsen 2021）。壁孔壁の中心部分には細胞壁の肥厚したトールスが存在し、周縁部にはセルロース微繊維の束が自転車のスポークのようにトールスをつなぐマルゴと呼ばれる構造がある。これらの構造は重要な機能を担っている。壁孔壁のマルゴにある大きな隙間を水は比較的小さな抵抗で流れることができる。仮道管に十分な大きさの気泡が侵入すると、水にかかっている負の圧力によって膨らみ仮道管の内腔を塞いでエンボリズムの状態になる。水が流れている仮道管には負の圧力がかかっているのに対して気泡が入った仮道管では圧力が水蒸気圧程度のほぼ 0 に近づいていく。この圧力差によってトールスが水の流れている仮道管側に引かれる。このときマルゴの細くて柔軟性のある細胞壁が伸びてトールスは壁孔口を塞ぎ、エンボリズムを起こした仮道管の中が気体で満たされても隣接した水の流れている仮道管へ気体が侵入することを防いでいる（図 3E）。

植物は、葉などの蒸散が起きた場所で生じる力によって根から葉へと水を引き上げて輸送する。この力は葉が水を失うほど強くなる。ここでは詳しい説明を省くが、この圧力の大きさは水ポテンシャルで表現でき、測定された値からは維管束内の水に -1 MPa 近い強い負の圧力が日常的にかかっていることが示されている（Scholander et al. 1965; Wei et al. 1999）。乾燥によるエンボリズムは乾燥ストレスで生じる過度な負の圧力が原因で起きる。乾燥ストレスが深刻になると仮道管内の水にかかる負の圧力は強くなり、壁孔口を塞ぐトールスを挟んでエンボリズムを起こした仮道管との圧力差が大きくなる。この圧力差により壁孔口を閉じている壁孔壁のトールスと壁孔の有縁部が接触している部分を気泡がすり抜けて、隣接する水で満たされた仮道管へ侵入することでエンボリズムが拡大していく（図 4A, Bouche et al. 2014）。もう一つの凍結融解によるエンボリズムは、その名の通り、仮道管内の水の凍結と融解で起きる（図 4A, Utsumi et al. 1999; Charra-Vaskou et al. 2023）。液体の水には気体が溶け込んでいるが、凍ると溶解度が著しく低下して気泡となって現れる。仮道管内の水が解けたあとにも気泡が残ると、周囲の水の負の圧力によって膨らんでエンボリズムの原因になる。水中にある気泡には、表面張力により気体を押す方向の圧力が働いていて、この力は気泡の直径が小さいほど強くなる。多くの小さな気泡はこの圧力によって水に溶け戻って消えてしまう。しかし、大きな気泡ができる直径が太い管では気泡が解け戻りにくく、そのまま残って道管内の水にかかる負の圧力によって膨らんでエンボリズムが起きる。このため、直径の太い道管をもつ種ほど、乾燥によるエンボリズムは起きないような弱い負の圧力でもエンボリズムが生じ、通水障害が観察される（Davis et al. 1999; Sevanto et al. 2012）。

野外で起きるエンボリズムによる通水阻害の程度は、採取した枝で測定した水の流れやすさと、同じ枝で圧力をかけて水を流し気泡を押し出したあとの水の流れやすさとの割合から、どれだけ枝を水が流れなくなっているかという通水損失率（PLC, percent loss of conductivity）で定量できる。今回の研究では酸性フクシン水溶液の赤い液体を枝の切り口から流して染まらなかった領域の面積から推定することも行っている（図 5）。エンボリズムは本部にかかる負の圧力の大きさに依存して広がる。そこで、負の圧力と PLC との関係である脆弱性曲線と呼ばれるグラフから、エンボリズムへの抵抗性を推定する。最大の通水度の 50%を失うときの水ポテンシャルは P_{50} と呼ばれ、エンボリズムへの抵抗性の指標として使われる（Martin-StPaul et al. 2017）。

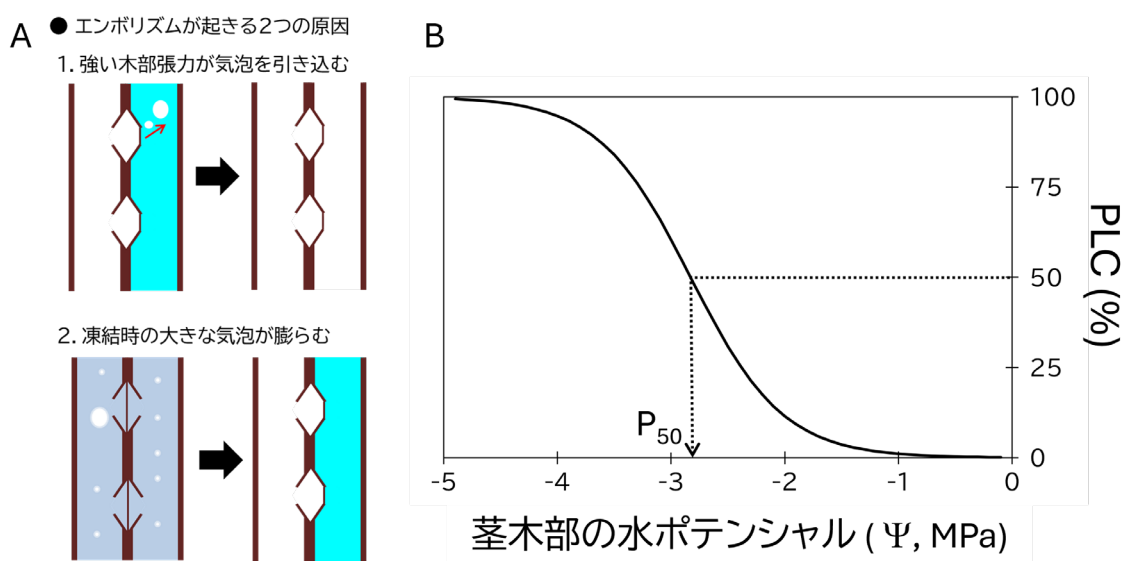


図 4. エンボリズムの発生メカニズムと脆弱性曲線

A エンボリズムの 2つの発生メカニズム。B 木部の水ポテンシャルと PLC の関係を脆弱性曲線と呼ぶ。多くの場合、ロジスティック曲線になり、 $PLC = 100/[1 + \exp\{b/25 \cdot (\Psi - c)\}]$ の式で回帰する。式中の b と c は定数である。通水度を 50%失う時の水ポテンシャルを P_{50} と呼び、エンボリズムへの抵抗性の指標とする。上記の式では b が P_{50} に一致する。

亜高山帯などの寒冷地の長く寒い冬の間には、枝の凍結融解と乾燥ストレスが同時に起きる。このため、針葉樹では冬季のエンボリズムによる枝の通水阻害を調べた研究がおこなわれてきた（Mayr et al. 2006; Ogasa et al. 2019; Maruta et al. 2020）。針葉樹の脆弱性曲線を測定した研究からは、直径が太い仮道管ほど凍結融解によって弱い負の圧力でも深刻な通水阻害が起きるが、寒冷地の針葉樹の仮道管は細くて通水阻害が起こりにくいことが示されてきた（Sperry and Sullivan 1992; Pittermann and Sperry 2003）。しかし、野外環境で寒冷地の常緑針葉樹で通水阻害の季節変化を測定すると、冬に 20–40%程度の PLC が観察され、春になると早々に解消することが報告されている（Sperry et al. 1994; Sparks et al. 2001; McCulloh et al. 2011）。また、森林限界などの風衝環境では、乾燥によるエンボリズムが起きない弱い負の圧力でも

通水障害が確認され、時には 100%近い PLC が観察されている (Mayr et al. 2006)。さらに、こうした深刻な通水障害が春以降に解消されていくことも報告されている。私たちは、細い仮道管でも冬に通水障害が起き、かつそれが解消されることに興味を持った。そして、冬に通水障害と回復が、日本の樹種でも起きることを確認し、その詳細なメカニズムを明らかにすることを目指した。

3. シラビソにおける冬の通水障害と応答

3-1. シラビソにおけるエンボリズムへの抵抗性

最初に、本研究の材料であるシラビソで脆弱性曲線を調べてエンボリズムによる通水障害が起きる環境条件について考えた。乾燥によるエンボリズムでの脆弱性曲線は、現地から採取してきた枝を実験室で徐々に乾燥させて異なる程度の水ポテンシャルの枝をつくり、酸性フクシンを流し、測定時の最も新しい年輪で、染まらなかった (=通水しなかった) 面積から PLC を計算して (図 5)、水ポテンシャルとの関係をみた。さらに、様々な水ポテンシャルの枝をチャンバー内で -6°C から $+6^{\circ}\text{C}$ まで変動する気温にさらして枝の凍結融解を繰り返し経験させて、凍結融解によるエンボリズムへの脆弱性曲線をつくった (図 4, 表 1)。その結果、乾燥によるエンボリズムでは、 P_{50} が -3.0 MPa 付近を示した。これに対して、凍結融解のサイクルの回数が 10 回、15 回と増えると、 P_{50} は増加し、より高い水ポテンシャル (0 に近い) で強い通水障害を起こすようになった。亜高山帯の冬のように乾燥ストレスに加えて高頻度の凍結融解がおきる環境では、通水障害が起こりやすくなることが推測される。また、枝の齢によってもエンボリズムの広がり方は異なっていた (表 1)。1 年生、3 年生、5 年生の枝で乾燥ストレスだけをかけた場合では、枝の齢が 1 年生、3 年生、5 年生と上がるほど P_{50} は低くなり、抵抗性が高くなっていた。この傾向は凍結融解によるエンボリズムでも確認でき、先端にある若い枝ほどエンボリズムが起きやすいことがわかった。

表1 シラビソのエンボリズムへの抵抗性(P_{50})に対する凍結融解処理と枝齢の影響

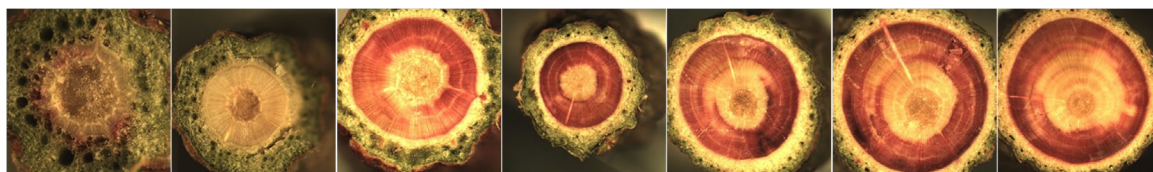
	1年生枝	3年生枝	5年生枝
乾燥のみ	-3.0 (0.19)	-3.1 (0.11)	-3.7 (0.13)
乾燥+10回の凍結融解	-2.0 (0.081)	-2.5 (0.071)	-2.7 (0.038)
乾燥+15回の凍結融解	-1.3 (0.050)		

値は、平均値 \pm 1SE を示す。

3-2. シラビソにおけるエンボリズムの発生とその回復

亜高山帯の冬にシラビソで通水障害が起きることを確かめるため、最も乾燥ストレスが深刻になる3月下旬に雨池峠を訪れて、旗型樹形を示すシラビソの3個体を選び測定を行った(Ogasa et al. 2019)。風上側、風下側を含めていろいろな方角に発達した枝が含まれるように1個体あたり20本の1年生の枝に印をつけて、そのうち半分をその場で採取して、3月下旬のPLCと水ポテンシャルを測定した。深刻な乾燥ストレスと通水障害は、冬の間に葉が傷を受けやすい風上側の枝だけで起きていると予想していたが、実際には、すべての方向で-2.5 MPa から-3.5 MPa という極めて低い水ポテンシャルが観察された。これは、気温が上がって枝の氷が解けて水が動いたことで、樹冠内の水ポテンシャルが均質化したためだと考えられる(Mayr and Charra-Vaskou 2007)。そして、枝の方角に関係なく多くの枝で完全に水が流れないことを意味するPLCが100%という値を記録した。同時に、7年生の枝も採取してそれぞれの枝齢ごとに通水障害の程度を観察すると、2年生までの若い枝ではほとんど染色液を通さないことが分かった(図5上)。このように枝を水が流れないのであれば、夏には樹冠のほとんどの若い枝が茶色く枯れてしまうはずである。

3月の風下側の枝



7月の風下側の枝

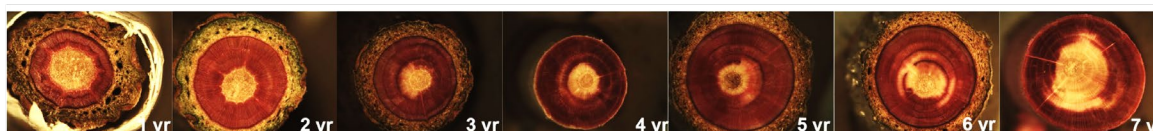


図5 旗型樹形を示すシラビソの風下側の枝の通水の様子

3月と7月に採取した7年生の枝に-5 kPaの負圧で酸性フクシン水溶液を流した後、枝を凍結乾燥させて横断面を撮影した。赤く染色されていない部分は通水障害により水が流れていなかったことを表す。上の画像が3月末、下の画像は7月に採取した枝を示した。それぞれ左から1年生、2年生、3年生、4年生、5年生、6年生、7年生の染色像を示した。

シラビソが新葉を展開する7月中旬に雨池峠を再訪して、印をつけたもう半分の枝で生死を確認し、生きている枝では個体が最も水を含んでいる夜明け前の水ポテンシャルとPLCを測定した。その結果、枯死した枝は全30本中1本だけで、生きているすべての枝で乾燥ストレスは解消し、そのほとんどでPLCが20%程度まで低下していた。7月に採取した枝でも若い枝での通水障害が解消されていた(図5下)。つまり、過去の研究で確認されたように、

シラビソでは冬に枝で深刻な通水阻害が起きるが、夏までに通水阻害を解消する生理機構をもち、葉と枝を維持して亜高山帯の風衝地での過酷な冬を生き延びていることがわかった。

3-3. 枝の通水能力と木部の水分分布の季節変化

冬の通水阻害が起きる様子とそれが解消される過程をもう少し詳しく調べるために、雨池峠を2月から約1か月おきに訪れ、個体の水分状態が最も回復している夜明け付近の水ポテンシャルと PLC の季節変化を測定した（図 6, Taneda et al. 2022）。

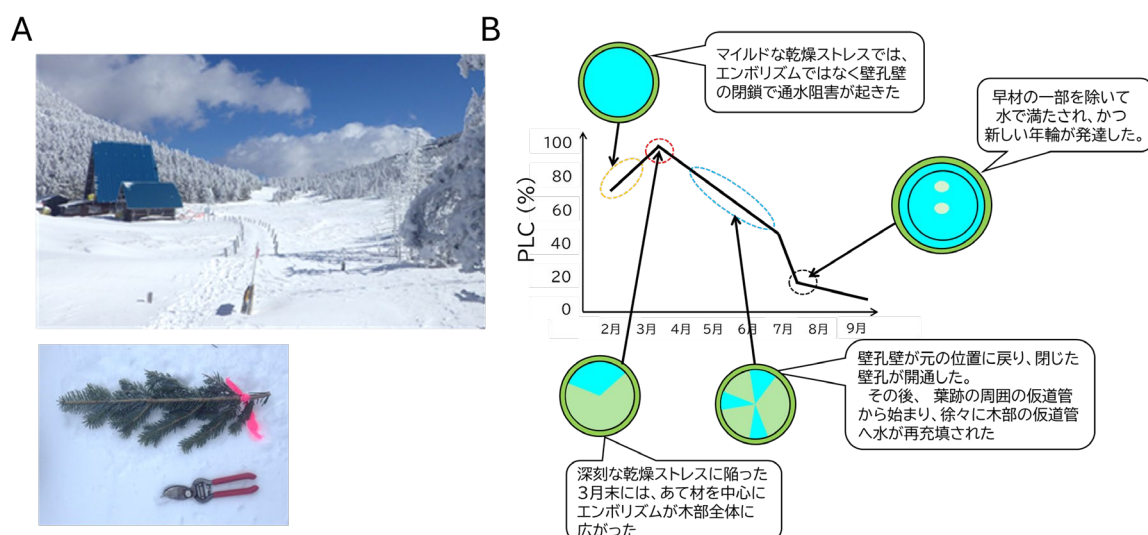


図 6. 風衝個体における水ポテンシャル、通水度の季節変化

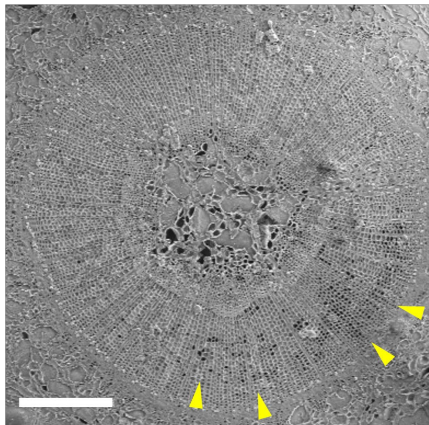
A 2月の雨池峠。採取した枝は一部の葉に傷があるものを選んだ。B PLC の季節変化。

夜明け付近の水ポテンシャルは、2月の初めから3月末までに -1.8 MPa から -2.6 MPa へ低下し、4月以降は急激に回復してその後は -0.5 MPa 以上の値をとった。一方で、PLC は約 70% だった2月初めから徐々に増加し3月末には 97% という極めて深刻な通水阻害を示す値を示した。その後、6月末までゆっくりと 60% 程度にまで低下し、7月末に一気に 20% へ低下した（図 6B）。こうした季節変化はこれまでの研究結果と一致していたが、これらの測定と同時に行った低温走査型電子顕微鏡（cryo-SEM）による枝木部の観察によって新たな通水阻害の発生と回復のメカニズムが明らかになった。

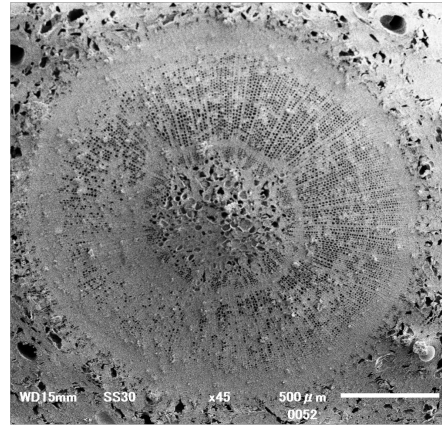
Cryo-SEM では、通常の走査型電子顕微鏡（SEM）の試料ステージを液体窒素で冷やすことで水分などを凍らせて固定した状態でサンプルの表面の様子を観察できる。今回の測定では、枝を採取したらすぐに液体窒素で凍らせることで木部内の水や空気の入った仮道管の分布、仮道管の微細構造を現地に近い状態で観察できるようにした。PLC 測定の結果から、2月や3月初めの枝では PLC の値と同じ 7 - 8 割近くの仮道管に空気が入っている状態を予想した。しかし、cryo-SEM で観察すると、水で満たされた仮道管がほとんどで、エンボリズムを起こした仮道管は背軸側に発達するあて材部分を中心にわずかに散在するのみだった（図 7A）。

ところが、3 月末のほぼ完全に水を流さなくなった枝では 70% 近くの仮道管でエンボリズムが確認された (図 7B)。水で満たされた仮道管の多くは孤立したかたちで存在しており、壁孔を介した横方向のつながりを使って水が流れる仮道管では、水輸送への寄与は小さいと考えられる。その後、5 月下旬には、エンボリズムを起こした仮道管はあて材部分に残るだけで材の他の部分は水で満たされていた (図 7C)。そして、7 月下旬には、肥大成長が始まって新しい年輪ができると同時に、多くの枝でほとんどの仮道管が水で満たされていた (図 7D)。以上は破壊的な測定ではあるが、調査期間を通して一部で葉が傷害を受けるなどの同程度の風衝環境にあった枝を採取しており、冬にエンボリズムにより空気の入った仮道管が夏に向かって再び水で満たされ、通水能力を回復させたことは確かであると考えている。

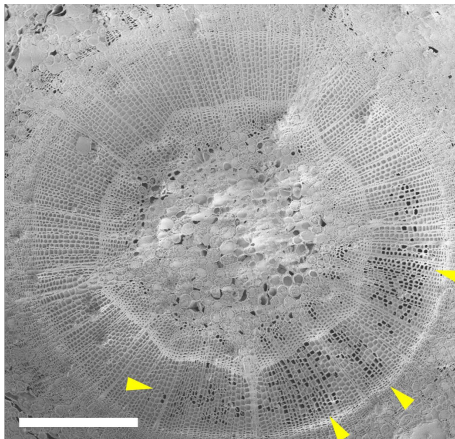
A 3月上旬



B 3月下旬



C 5月下旬



D 7月下旬

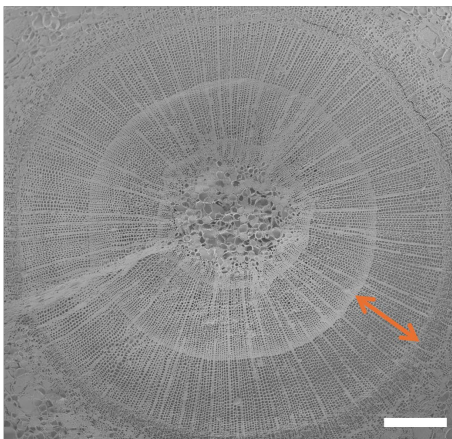
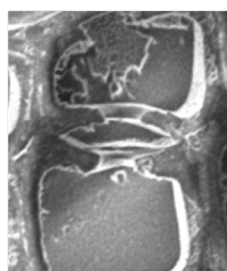
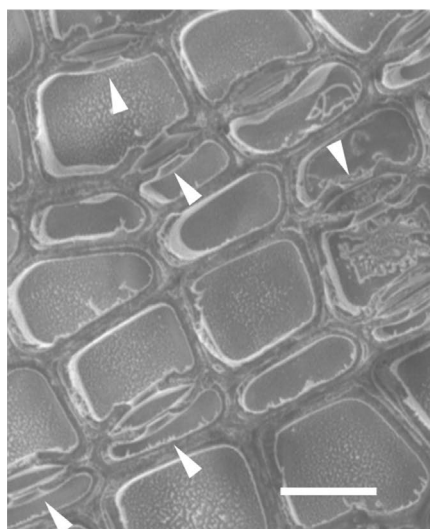


図 7. シラビソの 1 年生枝の木部の cryo-SEM による観察像

A-D はそれぞれ、3 月上旬、3 月下旬、5 月下旬、7 月下旬に採取した枝の木部の横断面の cryo-SEM による観察像。A, C の矢じりは、散在するエンボリズムを、D の矢印は新しい年輪を示す。スケールバーは A, C, D で 300 μm , B で 500 μm を表す。

2 月上旬の枝では、仮道管は水で満たされているにもかかわらず、水が流れないという矛盾した状態にあることがわかった。このときに何が起きているかを明らかにするために、cryo-

A 3月上旬



B 5月下旬

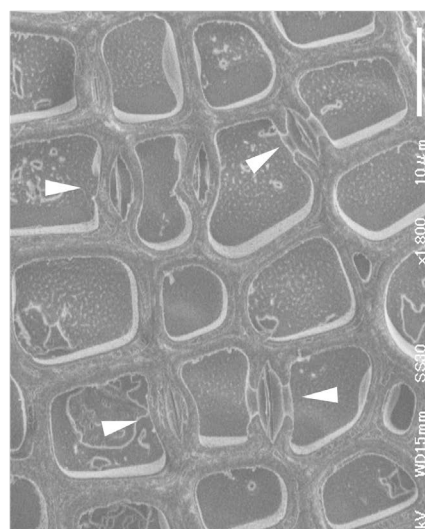


図8. シラビソの一年生枝の壁孔壁の cryo-SEM 観察像

A 3月上旬の枝で、右のイラストは壁孔壁が偏っている様子の模式図。矢じりは、閉鎖した壁孔壁を示す。2月上旬の枝でも同様の傾向を示した。B 5月下旬の枝で、多くの壁孔壁が真ん中の通常的位置に戻った（矢じり）。スケールバーは、10 μm を表す。

SEM でさらに詳しく観察すると、多くの仮道管で内腔が水で満たされているにも関わらず壁孔壁が動いてトールスが壁孔口を塞いでいる「閉鎖状態」になっていることがわかった（図8A）。壁孔が閉鎖されていれば、仮道管と仮道管の間で水が移動できなくなり、枝全体でみても通水阻害の状態になるはずだ。さらに、4月下旬以降は閉鎖した壁孔の頻度が急激に低下することから（図8B）、壁孔の閉鎖は可逆的であり、エンボリズムを起こした仮道管の内腔が水で再充填されるよりも先に壁孔口が開き、このことが春の早い時期の PLC の低下に寄与していることが示された。エンボリズムをともしない壁孔膜の閉鎖は、亜高山帯に分布するオオシラビソ (Maruta et al. 2022) やトウヒ（種子田ら未発表）でも確認しており、トールスとマルゴのある壁孔壁をもつ仮道管では広く見られる現象であると考えられる。

壁孔が閉鎖するメカニズムを考えるために、実験的に乾燥ストレスをかけた枝に凍結融解を経験させた (Taneda et al. 2022)。実験室内で約-2 MPa

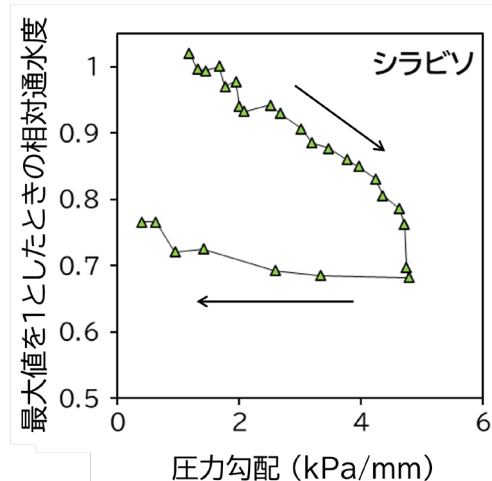


図9. シラビソの一年生枝に水を流したときの圧力と通水度の関係

矢印が示すように、1 kPa/mm から始めて 5 kPa/mm まで徐々に圧力勾配を高めていき、その後、圧力を下げ、そのときの通水度を測定した。最初の値に対する相対値で示した通水度は、顕著なヒステリシスを示した。シラビソの枝は、東京大学小石川植物園の植栽から採取した。

の乾燥ストレスのかけた枝では、隣接する2つの仮道管の内腔が水で満たされた状態で閉鎖した壁孔が10%未満にとどまるのに対して、凍結と融解を経験させると、閉鎖した壁孔が全体の50%近くまで増加していた。このことから、枝の凍結と融解が原因で仮道管の内腔が水で満たされた状態でも壁孔の閉鎖が起きることが示唆された。凍結時にどのようにして壁孔壁を変形させる圧力が生じるかは今後の課題である。私たちの仮説として、枝で凍結が広がっていく過程で、凍って体積が膨張した仮道管内の氷がまだ凍っていない水を押すことで流れができて、これが壁孔壁を動かすと考えている。シラビソの枝に正の圧力をかけて水を流すと、圧力の上昇とともに通水度が低下していき、その後、圧力を緩和しても通水度の低下は戻らなかった(図9)。この過程は、圧力が上がって流れが速くなりトールスにかかる圧力抗力が強くなってマルゴが変形してトールスが仮道管の二次細胞壁の有縁部に押し付けられるとともに壁孔口を塞ぐことを示唆している。また、有縁部と接した壁孔壁は弾性的にすぐに通常の位置に戻ることはなく、閉じた状態が維持されていた。この現象に対しては、流れで押し付けられた壁孔壁は分子間力で有縁部に付着し固定され、その後、徐々に隙間へ水分子が入り込むことで剥がれて弾性的に元の位置に戻るのではないかと想像している(Thomas and Kringstad 1971)。

3-4. エンボリズムからの回復とその限界

気体で満たされエンボリズムを起こした仮道管は、4月以降に水が再充填されて、通水能力が回復していった。仮道管の中から気泡を追い出して再び水で満たすためには、気体に正の圧力をかけて水に溶かす過程が必要である。ここでは、水で満たされた仮道管には負の圧力がかかっている状況でエンボリズムを起こした仮道管内の気体には正の圧力をかける必要がある。また、エンボリズムを起こして根からの水の輸送経路が絶たれているにもかかわらず充填する水をどこかからもってこなくてはならない。これらに対して、オーストリアのインスブルック大学の Mayr 教授らは以下のような仮説を提示している。エンボリズムを起こした仮道管の内腔へ隣接した放射組織の生きた細胞からショ糖のような低分子量の物質が輸送され、そこへ浸透的に水が移動する。水の体積が増えた分だけ気相に圧力がかかり気体が水に溶ける、というものである(Mayr et al. 2014)。エンボリズムを起こした仮道管では壁孔が閉鎖しているので(図3E)、周囲の仮道管の水にかかる負の圧力の影響を受けない。さらに、最充填のための水は、雨や雪解けで葉の表面を濡らしたもので、葉表面から吸収され葉と枝木部をつなぐ葉跡(leaf trace)という維管束(図10A)を通して水が移動する、と推察している。シラビソで調べると、細長い形状の仮道管の細胞は少なくとも1回以上は放射組織の細胞と接している。また、4月末の cryo-SEM による木部の観察像では二次木部の葉跡周辺の仮道管は水で満たされていることがわかる(図10B)。さらにシラビソの葉の表面からの水

の吸収速度は、傷のない葉では極めて小さかったが、傷のついた葉や新しい枝の葉の落ちた後の葉痕からは水が入りやすいことを確認している（種子田ら未発表）。これらの結果は、Mayr らの仮説を支持する傍証となるだろう。この仮説で提唱された再充填に関するメカニズムが正しいとすれば、その放射組織の細胞から浸透的に水を移動させるためには、エンボリズムを起こした細胞内の液相の浸透ポテンシャルを放射組織の細胞よりも下げる必要がある。強い乾燥ストレスがかかっている間は放射組織の生きている細胞も水ポテンシャルが低下しているはずであり、より多くのショ糖をエンボリズムの起きた仮道管へ輸送しないといけない。そこで、乾燥ストレスのかかった冬の間ではなく、水ポテンシャルが劇的に回復する 4 月以降でエンボリズムを起こした仮道管への水の再充填が起きることも、Mayr らの仮説と矛盾しないだろう（図 5）。

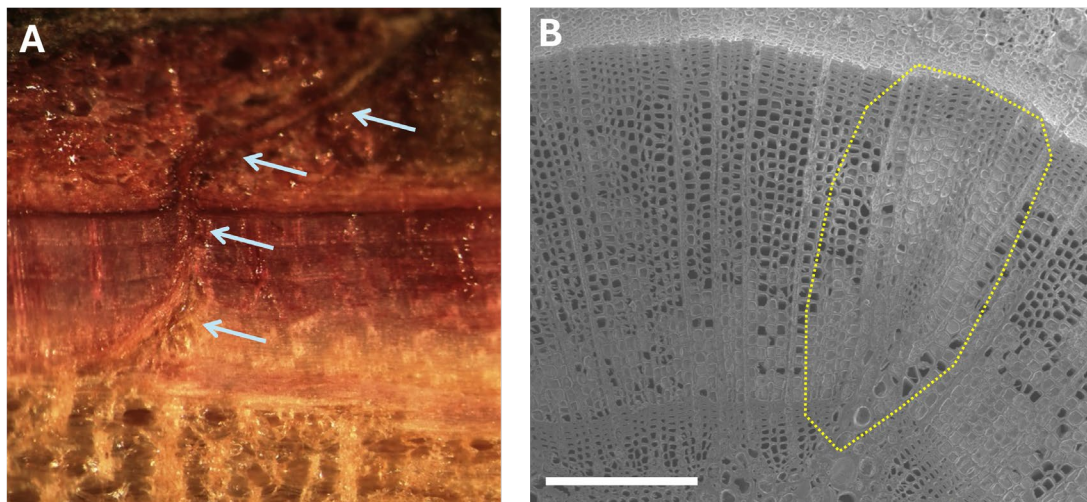


図 10. 枝木部における葉跡周辺の水分布

A オオシラビソの葉跡の走行。葉からサフラニン水溶液を吸わせた 4 年生枝の縦断面。矢印は葉跡を示し、髄付近の一次木部から二次木部と内樹皮を通して、針葉の葉脈に繋がる。B シラビソの 4 月下旬の 1 年生枝のサンプルの cryo-SEM 画像。点線で囲まれた葉跡周辺の仮道管は水で満たされている。B のスケールバーは、200 μm を示す。

こうした通水能力の回復過程を知ると、冬季の乾燥ストレスもエンボリズムも亜高山帯の常緑針葉樹の枯死要因にならないと結論付けてしまいそうだが、そうではない例を最後に示す。図 11 に示した枝は、風衝環境にある個体の枝で、3 月末に採取したものである。葉がついている 3 つの側枝で当年生シュートと途中の枝の水ポテンシャルを測定した。3 本ともに葉は深緑色をして外見では生きているように見える。しかし、2 本の小枝（図 11 の枝_1、枝_2）では -3.5 MPa 前後の値を示していたのに対して、1 本だけは -5 MPa よりも低い水ポテンシャルを示し（図 11 の枝_3）、その基部は -3.2 MPa と他の部位と同じような値を示していた。各枝の木部を cryo-SEM で観察すると、枝_3 のみ木部にあるすべての仮道管から水がなくなっており、内樹皮の細胞も水を失って縮み、空隙が目立っていた。図 5 や表 1 からわかるように、エンボリズムは先端の若い枝ほど起こりやすい。枝_3 では、冬の間に関わらず

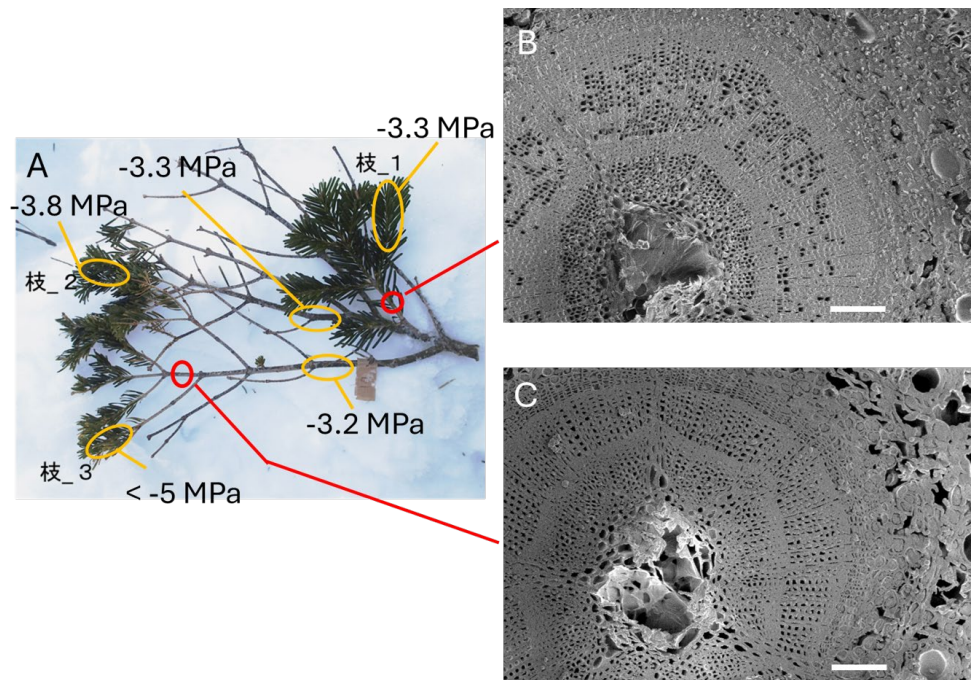


図 1 1. 枝内の水ポテンシャルの分布と枝木部の水分分布

A 3 本に分かれた枝で、葉の水ポテンシャルと枝の水ポテンシャルを測定した。B 枝_1 と枝_3 の木部の水分分布を cryo-SEM で観察した。枝_3 は、-5MPa 未満の水ポテンシャルを示し、枝木部ではほぼすべての仮道管でエンボリズムが起きていた。B と C のスケールバーは、200 μm を示す。

で葉から多くの水が失われて水ポテンシャルが下がり、まず若い枝で致命的なエンボリズムが起き、樹皮も水の供給が絶えて枯死したような状態になったと考えられる。エンボリズムにより気体で塞がれた仮道管では維管束を通した枝の先端側と基部側での水のつながりが断たれてしまう。このため葉の低い水ポテンシャルによる負の圧力は枝の基部やさらには他の側枝にまでは伝わらない（脆弱性による分断化, Tyree and Sperry 1988）。このため、この測定に使った枝を切らずに木に残しておけば、枝_3 だけが枯死して他の小枝は生き残るようなことが起きたと予想される。

4. おわりに

日本の中部山岳の亜高山帯で優占する常緑針葉樹であるシラビソでは、冬の乾燥ストレスが穏やかなうちは壁孔の閉鎖によって通水障害が起き、やがて乾燥によるエンボリズムも起きるような強い乾燥ストレスへと深刻化すると重度なエンボリズムも起きて枝をほぼ水を通らない状態になった。しかし、冬の間に起きる深刻な通水障害は、夏に向かって、まずは壁孔閉鎖が解消され、次にエンボリズムを起こした仮道管に水が充填されていき、さらに新しい木部の成長とともに枝の通水能力が回復していくことがわかった。一方で、冬の間に傷つくなどによって葉から水が蒸発しやすくなると、水ポテンシャルが回復する春を迎える前に

過度に乾燥ストレスがかかって枯死してしまう可能性が示唆された。致命的なエンボリズムの進行は枝の枯死を促進する一方で、枝の基部側との水の連絡を絶って致命的な乾燥ストレスの影響を枝レベルに限定させる効果があることも示唆された。

さらに詳しくシラビソの越冬戦略に迫るためには、今回、見てきた現象が起きる閾値となる条件を定量的に明らかにしていく必要があるだろう。例えば、亜高山帯のような場所で、壁孔の閉鎖だけでなくエンボリズムが起きる条件、仮道管への再充填が起こらなくなる条件、冬の間に致死的な乾燥ストレスが起きほどに脱水が進むような葉の損傷の程度などである。先述の Mayr らは、ドイツトウヒで 10 年にわたって冬の終わりの PLC と水ポテンシャルを測定し続け、これらが気象条件によって大きく変化し、冬の長さや積雪期間の長さが枝の通水阻害や乾燥ストレスの程度と正に関係することを明らかにしている (Mayr et al. 2020)。植物側の応答の閾値が具体的にわかっていけば、温暖化で変化する気象条件に対して、森林の応答や森林限界が生じる条件など常緑針葉樹とそれが構成する森林の応答をより正確に理解し、予測できるようになるはずだ。

謝辞

本研究の最初の 3 年間での大條弘貴氏、大塚晃弘氏の活躍がなければその後の発展はなかった。寺島一郎氏、福田健二氏、Stefan Mayr 氏、宮沢良行氏、清水文一氏には、研究を進めるうえで貴重な助言や励ましの言葉をいただいた。黒田克己氏、佐野雄三氏には、cryo-SEM や FE-SEM での観察を基礎から教えていただいた。舟山幸子氏には、測定のこまごましたところから助けていただいた。縞枯山荘、麦草ヒュッテのスタッフの方にはフィールド調査で助けていただいた。科研費 (17H03825, 21H02228)、守谷研究助成から資金的な援助をいただいた。この場を借りてお礼申し上げる。

引用文献

- Bouche PS, Larter M, Domec JC, Burtlett R, Gasson P, Jansen S, Delzon S (2014) A broad survey of hydraulic and mechanical safety in the xylem of conifers. *J Exp Bot* 65: 4419–4431. doi.org/10.1093/jxb/eru218
- Bowling DR, Logan BA, Hufkens K, Aubrecht DM, Richardson AD, Burns SP, Angregg WR, Blanken PD, Eiriksson DP (2018) Limitations to winter and spring photosynthesis of a Rocky Mountain subalpine forest. *Agri For Meteorol* 252: 241–255. doi.org/10.1016/j.agrformet.2018.01.025
- Chang CYY, Bräutigam K, Hüner NPA, Ensminger I (2021) Champions of winter survival: cold acclimation and molecular regulation of cold hardiness in evergreen conifers. *New Phytol* 229: 675–691. doi.org/10.1111/nph.16904
- Charra-Vaskou K, Lintunen A, Améglio T, Badel E, Cochard H, Mayr S, Salmon Y, Suhonen H, van Rooij M, Charrier G (2023) Xylem embolism and bubble formation during freezing suggest

- complex dynamics of pressure in *Betula pendula* stems. *J Exp Bot* 74: 5840–5853.
doi.org/10.1093/jxb/erad275
- Wei C, Tyree MT, Steudle E (1999) Direct measurement of xylem pressure in leaves of intact maize plants. A test of the cohesion-tension theory taking hydraulic architecture into consideration. *Plant Physiol* 21: 1191–1205. doi.org/10.1104/pp.121.4.1191
- Davis SD, Sperry JS, Hacke UG (1999) The relationship between xylem conduit diameter and cavitation caused by freezing. *Ame J of Bot* 86: 1367–1372. doi.org/10.2307/2656919
- Demmig-Adams B, Adams WW (2006) Photoprotection in an ecological context: The remarkable complexity of thermal energy dissipation. *New Phytol* 172: 11–21. doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01835.x
- Hadley JL, Smith WK (1986) Wind effects on needles of timberline conifers: seasonal influence on mortality. *Ecology* 67: 12–19. doi.org/10.2307/1938498
- Jacobsen AL (2021) Diversity in conduit and pit structure among extant gymnosperm taxa. *Ame J Bot* 108: 559–570. doi.org/10.1002/ajb2.1641
- Martin-StPaul N, Delzon S, Cochard H (2017) Plant resistance to drought depends on timely stomatal closure. *Ecol Letters* 20: 1437–1447. <https://doi.org/10.1111/ele.12851>
- Maruta E, Kubota M, Ikeda T (2020) Effects of xylem embolism on the winter survival of *Abies veitchii* shoots in an upper subalpine region of central Japan. *Sci Reports* 10: 6594. doi.org/10.1038/s41598-020-62651-2
- Maruta E, Yazaki K, Ogasa MY, Taneda H (2022) Pit aspiration causes an apparent loss of xylem hydraulic conductivity in a subalpine fir (*Abies mariesii* Mast.) overwintering at the alpine timberline. *Tree Physiol* 42: 1228–1238. doi.org/10.1093/treephys/tpab173
- Mayr S, Charra-Vaskou K (2007) Winter at the alpine timberline causes complex within-tree patterns of water potential and embolism in *Picea abies*. *Physiol Plant* 131: 131–139. doi.org/10.1111/j.1399-3054.2007.00942.x
- Mayr S, Hacke U, Schmid P, Schwienbacher F, Gruber A (2006) Frost drought in conifers at the alpine timberline: Xylem dysfunction and adaptations. *Ecology* 87: 3175–3185. [https://doi.org/10.1890/0012-9658\(2006\)87\[3175:FDICAT\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/0012-9658(2006)87[3175:FDICAT]2.0.CO;2)
- Mayr S, Schmid P, Beikircher B, Feng F, Badel E (2020) Die hard: timberline conifers survive annual winter embolism. *New Phytol* 226: 13–20. <https://doi.org/10.1111/nph.16304>
- Mayr S, Schmid P, Laur J, Rosner S, Charra-Vaskou K, Dämon B, Hacke UW (2014) Uptake of water via branches helps timberline conifers refill embolized xylem in late winter. *Plant Physiol* 164: 1731–1740. doi.org/10.1104/pp.114.236646
- Mayr S, Schmid P, Beikircher B (2012) Plant water relations in alpine winter. In C Lutz, ed, *Plants in Alpine Region: Cell Physiology of Adaptation and Survival Strategies*. Springer, Wien, pp 151–161.
- McCulloh KA, Johnson DM, Meinzer FC, Lachenbruch B (2011) An annual pattern of native embolism in upper branches of four tall conifer species. *Ame J Bot* 98: 1007–1015. doi:10.3732/ajb.1000503

- Nakamoto A, Ikeda T, Maruta E (2012) Needle browning and death in *Pinus pumila* in the alpine region of central Japan were not related to mechanical damage of cuticle and cuticle thickness. *Canadian J For Res* 42: 167–178. doi.org/10.1139/x11-153
- Ogasa MY, Taneda H, Ooeda H, Ohtsuka A, Maruta E, David W (2019) Repair of severe winter xylem embolism supports summer water transport and carbon gain in flagged crowns of the subalpine conifer *Abies veitchii*. *Tree Physiol* 39: 1725–1735. doi: 10.1093/treephys/tpz066
- Pittermann J, Sperry JS (2003) Tracheid diameter is the key trait determining the extent of freezing-induced embolism in conifers. *Tree Physiol* 23: 907–914. doi: 10.1093/treephys/23.13.907
- 酒井昭 (1995) 植物の分布と環境適応 熱帯から極地・砂漠へ 朝倉書店.
- Scholander PF, Hammel HT, Bradstreet ED, Hemmingsen EA (1965) Sap pressure in vascular plants. *Science* 148: 339–346. doi: 10.1126/science.148.3668.339
- Sevanto S, Michele Holbrook N, Ball MC (2012) Freeze/thaw-induced embolism: Probability of critical bubble formation depends on speed of ice formation. *Fron Plant Sci* 3: 1–12. doi.org/10.3389/fpls.2012.00107
- Sparks JP, Campbell GS, Black AR (2001) Water content, hydraulic conductivity, and ice formation in winter stems of *Pinus contorta*: A TDR case study. *Oecologia* 127: 468–475. doi.org/10.1007/s004420000587
- Sperry JS, Nichols KL, Sullivan JEM, Eastlack SE (1994) Xylem embolism in ring-porous, diffuse-porous, and coniferous trees of northern Utah and interior Alaska. *Ecology* 75: 1736–1752. doi.org/10.2307/1939633
- Sperry JS, Sullivan JEM (1992) Xylem embolism in response to freeze-thaw cycles and water stress in ring-porous, diffuse-porous, and conifer species. *Plant Physiol* 100:605–613. https://doi.org/10.1104/pp.100.2.605
- Taneda H, Ogasa MY, Yazaki K, Funayama-Noguchi S, Miyazawa Y, Mayr S, Maruta EI (2022) Impact of freeze–thaw-induced pit aspiration on stem water transport in the subalpine conifer *Abies veitchii*. *Plant Physiol* 190: 1687–1698. doi.org/10.1093/plphys/kiac388
- Taneda H, Tateno M (2005) Hydraulic conductivity, photosynthesis and leaf water balance in six evergreen woody species from fall to winter. *Tree Physiol* 25: 299–306. doi.org/10.1093/treephys/25.3.299
- Taneda H, Yazaki K, Hiramatsu T, Shimizu B, Sugiura D, Miyazawa Y (2021) A simple method to observe water distribution in tracheid-bearing wood of subalpine conifer. *Trees* 35: 697–707. doi.org/10.1007/s00468-020-02070-y
- Thomas RJ, Kringstad KP (1971) The role of hydrogen bonding in pit aspiration. *Holzforschung* 25: 143–149.
- Tyree MT, Sperry JS (1988) Do woody plants operate near the point of catastrophic xylem dysfunction caused by dynamic water stress? *Plant Physiol* 88: 574–580. doi.org/10.1104/pp.88.3.574
- Tyree MT, Zimmermann MH (2002) Xylem structure and the ascent of sap. (TT Timell, Ed.). Berlin: Springer Verlag.

Utsumi Y, Sano Y, Funada R, Fujikawa S, Ohtani J (1999) The progression of cavitation in earlywood vessels of *Fraxinus mandshurica* var. *japonica* during freezing and thawing. *Plant Physiol* 121: 897–904. doi.org/10.1104/pp.121.3.897

自然環境下における植物—ウイルス相互作用の季節性

本庄 三恵

京都大学 生態学研究センター

〒520-2113 滋賀県大津市平野 2 丁目 509-3

Seasonality of plant-virus interactions in natural environments

Mie N. Honjo

¹Center for Ecological Research, Kyoto University, 509-3 Hirano, Otsu, Shiga, 520-2113, Japan

Keywords: *Arabidopsis halleri*, natural environment, season, temperature, Turnip mosaic virus

DOI: 10.24485/bsj-review.16c5.00289

1. はじめに

ウイルスはしばしば植物の大量枯死を引き起こし、農作物への感染による経済損失は世界で 300 億ドルに達する (Jones and Naidu 2019)。ウイルスは、ゲノムサイズが小さく宿主内で急速に増殖し、短期間で瞬く間に病気を広げる。カビや細菌と異なり、宿主に寄生しなければ増殖できない絶対寄生性であり、宿主のエネルギーを使ってしか増殖できないため、これまで病気を引き起こすような負の側面に着目し、研究が行われてきた。

一方、自然界においてウイルスが野生植物にどの程度感染し、影響を与えているのかについての研究は限られている (Roossinck and García-Arenal 2015; Roossinck et al. 2015)。その理由として、ウイルス自体は目に見えず、病徴があっても生理障害との区別が難しいこと、全てのウイルスに共通の配列がないため未知のウイルスを検出する有効な手法がなかったことなどがあげられる。しかし近年、次世代シーケンサーの発達により、網羅的にウイルスを検出する手法が確立されてきた (Roossinck et al. 2012; Roossinck 2015a; Nagano et al. 2015)。その結果、野生植物から次々と未知ウイルスが検出されるとともに、病徴を示さずにウイルスに感染している例が多く報告されている (Prendeville et al. 2012; Roossinck 2015b; Hasiów-Jaroszewska 2021)。自己増殖できないウイルスにとって、宿主を駆逐することは種の存続の上で必ずしも有利な戦略ではない。宿主個体数が限られた自然環境では、宿主を生かしつつ自らも増殖する戦略のほうが、進化的に有利であると考えられる (May and Anderson 1983; Remold 2002)。ウイルスは、自然界の中で野生植物とどのように相互作用し宿主を駆逐せず共存しているのだろうか。環境が大きく変動する季節環境下で、1 個体の宿主に感染し続けるウイルスの研究から見えてきたのは、必ずしも寄生的・共生的といった一定の関係ではなく、その関係が環境とともに変化する姿である。本総説では、自然生態系における植物とウイルスの相互作用について季節性に着目し、その最新の知見を紹介する。

2. ウイルスの長期感染

植物は、一度感染したウイルスを排除する機構を持たない。そのため、感染個体は生涯ウイルスを保持することになり、多年生植物の場合は、それが何年にもわたる。例えば、リンゴ・ブドウなどの樹木においても、ウイルスの長期感染が報告されており、モモの木に感染した Plum pox virus では、13 年に渡り一度感染したウイルスが樹木の枝全体に広がっていることが塩基配列の解析で明らかになっている (Jridi et al. 2006)。また、多年生のジャガイモやイチゴ、ニンニクなどでは、栄養繁殖個体を苗として用いるため、一度ウイルスが感染すると苗を通して次世代にも伝わる。

農業生態系においては一年生植物が耕作地の約 70%を占め (Pimentel et al. 2012)、農作物を中心に進んできた植物ウイルスの研究の多くは一年生植物を対象にしたものが多い。一方、地球上で現在知られている維管束植物約 24 万種 (Judd et al. 2002) のうち、一年生植物は全種の 6%、草本だけに限っても 15%にとどまる (Poppenwimer et al. 2023)。つまり、ほとんどの植物種は多年生植物である。このことから、自然生態系における植物とウイルスの相互作用を理解するには、多年生植物で見られる長期感染にも着目することが重要であるが、その知見は限られている。

3. 相互作用の温度依存性

ウイルスの増殖や病徴発現といった相互作用は、宿主植物側とウイルス側の要因に加え、温度や土壌水分量、栄養状態などの環境要因の影響を受ける。温度は、その中でも季節で大きく変化する因子の 1 つである。植物とウイルスの組み合わせごとに、ウイルスが増殖しやすい温度（増殖至適温度）を表 1 にまとめた。表中の多くの組み合わせで 25°C 前後がウイルスの増殖が早い、あるいは蓄積量が多くなる至適温度である。例えば、キャベツでの、カブモザイクウイルス (Turnip mosaic virus: TuMV) の増殖至適温度を 13-33°C の温度域で調べた研究では、13-28°C の間では温度上昇とともにウイルス蓄積量が増加し、23°C と 28°C で最も多くのウイルスが検出された (Chung et al. 2015)。しかし、33°C では 23°C と 28°C よりウイルス量が抑制された。もっともウイルス量の増殖が少ない 13°C の低温では全身にウイルスが広がるまで 28°C の時の 5 倍以上の時間がかかった (Chung et al. 2015)。ジャガイモでの Potato virus Y (PVY) の増殖を 12-35°C について調べた研究では、12°C と 35°C では全身感染がみられず、植物全体にウイルスが広がるまで 20°C で 14.0 日、28°C で 5.7 日かかった (Choi et al. 2017)。一方、オオムギと Soil-borne wheat mosaic virus (SBWMV) の組み合わせの場合、より低い温度が至適温度となっている (Ohsato et al. 2003)。プロトプラストを用いた実験で、15, 17, 20, 22, 25°C のうち、17°C でもっともウイルスの増殖量が多くみられた。筆者らは、至適温度が一般的な温度より低い理由として、秋から翌春にかけて冷涼な気候で生育する宿主植物に適応した結果ではないかと考察している (Ohsato et al. 2003)。

表 1. ウイルスの増殖至適温度

ウイルス	宿主植物	実験温度域	実験期間	至適温度	文献
Soil-borne wheat mosaic virus (SBWMV)	<i>Hordeum vulgare</i> L. cv Minorimugi	15, 17, 20, 22, 25°C	48h	17°C	Ohsato et al. 2003
Tobacco mosaic virus (TMV)	<i>Nicotiana tabacum</i>	16, 20, 24, 28, 32, 34, 36°C	22 days	24°C	Lebeurier and Hirth 1966
Tomato bushy stunt virus (TBSV)	<i>Nicotiana benthamiana</i>	21, 27, 32°C	18h	27°C	Jones et al. 1990
Turnip mosaic virus (TuMV)	(<i>Brassica campestris</i>) Chinese cabbage	13,18,23,28,33°C	30 days	23, 28°C	Chung et al. 2015
Turnip mosaic virus	<i>Brassica napus</i>	24, 28°C	3 days	28°C	Amari et al. 2021
Turnip mosaic virus	<i>Arabidopsis halleri</i>	10°C/5°C, 25°C/20°C (明期/暗期)	28 days	25/20°C	Honjo et al. 2025
Potato virus Y (PVY)	<i>Solanum tuberosum</i> L. cv. Chu-Baek	12, 16, 20, 24, 28, 32, 35°C	17 days	28°C	Choi et al. 2017

多くの植物とウイルスの組み合わせで、温度が高くなると宿主のウイルスに対する抵抗性が上がり、結果として新しく展開する葉では病徴が回復する現象が知られている。この現象はヒートマスキング (heat masking) と呼ばれている。例えば、前出のキャベツと TuMV の温度実験では、ウイルスの増殖が抑えられた 13°C で病徴がなく、18-28°C で病徴があり、33°C では病徴が弱いという、比較的ウイルス量と病徴が相関する関係が見られた (Chung et al. 2015)。タバコとキュウリモザイクウイルス (Cucumber mosaic virus: CMV) の例では、接種初期 (6 日目) は低温 (18°C) より高温 (28°C) で最もウイルスが多く、病徴も量に比例して、高温で強かったが、接種 28 日後には逆転し、上位葉の高温環境でウイルス量が少なくなっていた (Zhao et al. 2016)。つまり、ヒートマスキング (病徴回復) には一定の時間が必要となってくる。

温度依存性がどのように制御されているのか、その分子メカニズムが徐々に明らかになってきている。Cymbidium ring spot virus (CymRSV) を接種した *N. benthamiana* 植物は、15, 21, 24°C で 2 週間以内に枯死するが、27°C では症状の減弱が見られる (Szittyá et al. 2003)。Szittyá ら (2003) は、この現象が RNA サイレンシングというウイルスのゲノム RNA を配列特異的に切断するという宿主の防御機構が関与していることを示した。RNA サイレンシングが、27°C で働きウイルス量を減少させることで、病徴発現を弱めたのである。その証拠に、27°C ではウイルスの RNA が切断され発生する短い断片の siRNA の量が増加していた。一方で、サイレンシングは低温では働かず、病徴発現も温度に依存して大きく変化する (Szittyá et al.

2003)。また, *Citrus psorosis virus* (CPsV) を果樹スイートオレンジ (*Citrus sinensis*) の苗に接種した場合 26°C/18°C (明/暗) より 32°C/26°C でウイルス蓄積量が少なく, 若い葉での病徴が緩和され, ウイルス量と病徴の強さが関係していることが分かった。さらに, ウイルス由来の短鎖 RNA が 32°C/26°C で増加していたことから, より高い温度でサイレンシングが活性化され, ウイルス蓄積量の抑制が起こった (Velázquez et al. 2010)。このように RNA サイレンシングは, ウイルスに対する植物防御において重要な役割を果たし, 病徴発現とも関係する (Voinnet 2001)。一方, *Nicotiana benthamiana* では tomato ringspot virus (ToRSV) による病徴回復が 21°C では見られず, 27°C の高温で見られ, これがウイルス RNA の減少ではなく, 宿主タンパク質 AGO1 を介したウイルスゲノムである RNA2 の翻訳抑制に起因することが報告されている (Ghoshal and Sanfaçon 2014)。ヒートマスキングは, ウイルスの翻訳レベルでの制御によっても引き起こされるようである。

4. 生態系での植物とウイルスの関係

4-1. 野生植物のモデルとしてのハクサンハタザオ

それでは, 植物が実際に生育する自然環境下では, 植物—ウイルスの相互作用はどのように変化しているのだろうか。上述の一定環境下で示されたように, 温度によりウイルス量や病徴が異なることから, 気温が大きく変動する野外環境下においても, 感染個体内でウイルスとの相互作用は季節によって変化することが予想される。

筆者らは, 年間を通して相互作用の季節性を研究するため, 冬季も落葉せず 1 年中葉をつける常緑多年生の草本ハクサンハタザオ (*Arabidopsis halleri* (L.) O'Kane & Al-Shehbaz subsp. *gemmifera* (Matsum.) O'Kane & Al-Shehbaz) を研究対象とした。ハクサンハタザオは, 4 月から 5 月に開花し, 種子繁殖を行うとともに, 伸ばした花茎に空中ロゼットを形成し, そこから不定根を出しクローンでも繁殖を行う。2 倍体でゲノムが解読されており, モデル植物シロイヌナズナの近縁種であるため, 配列情報から遺伝子の機能が推定でき遺伝子発現応答の解析が可能な野生のモデル植物として有効である (Honjo and Kudoh 2019)。

植物の応答を遺伝子発現レベルで網羅的に解析する RNA-seq は, 着目する形質を絞ることなく, 一度に植物の状態を把握できる有効な手段といえる。植物が実際に生育する環境に適用する場合は, 環境や植物の遺伝的なばらつきが問題となるが, 多検体を対象とすることで精度よく解析できる。筆者らは, 安価でハイスループットな RNA-seq 法を構築し, フィールドトランスクリプトームの研究を進めている。

4-2. 宿主内でのウイルスの動態

ハクサンハタザオに感染するウイルスの種数は, RNA-seq を用いた網羅的ウイルス検出により, 現在 5 種を報告している (Kamitani et al. 2016; Kamitani et al. 2017; 本庄ら 2025)。このうち, カブモザイクウイルス (Turnip mosaic virus: TuMV) は, 兵庫県多可郡のハクサンハタザオ調査地で 27.4%-57% の感染率を示す (Kamitani et al. 2016; Honjo et al. 2020; Otsubo et al. 2025)。また, 宿主範囲が比較的広く, 主要な農作物ウイルスの 1 つでもあるが, ハクサ

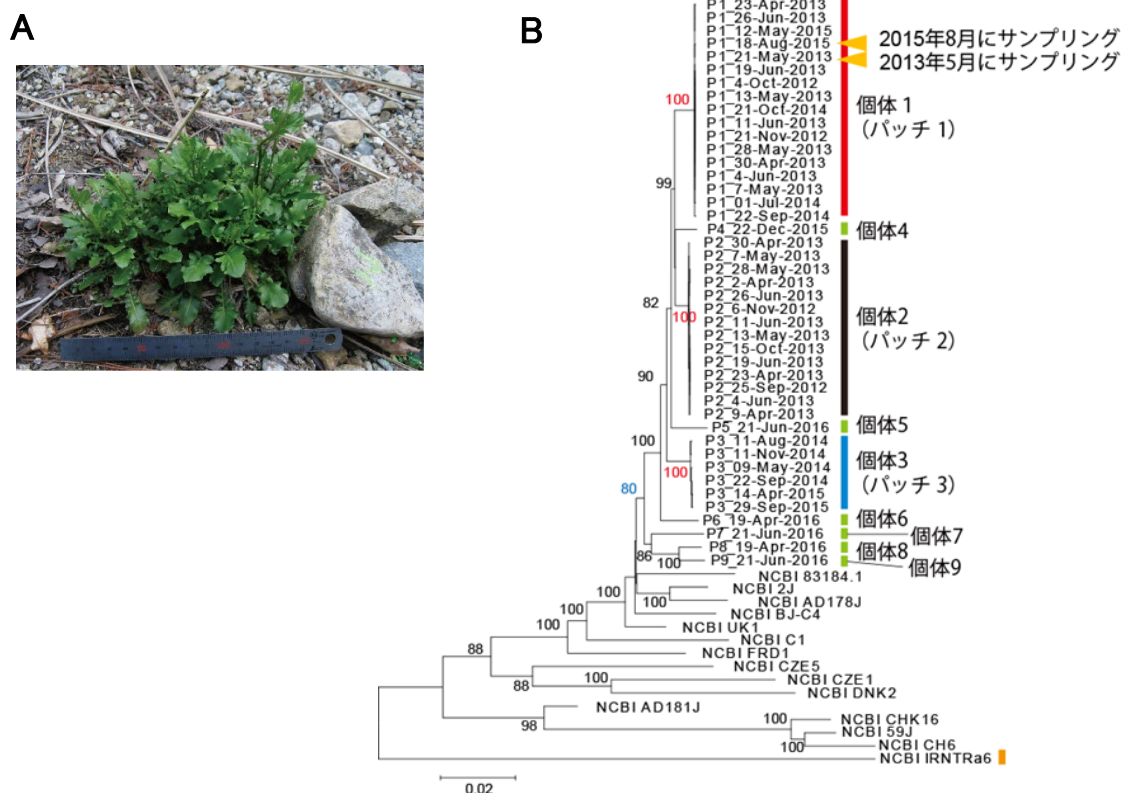


図 1. TuMV に感染したハクサンハタザオと TuMV の全ゲノム配列の系統樹

A. TuMV に感染したハクサンハタザオのパッチ。明確な病徴は見られない。**B.** 個体 1-9 は、ハクサンハタザオの自然集団から RNA-seq により得られた TuMV の配列。個体 1-3 は 1.5-3 年にわたり継続サンプリングを行い、サンプル ID は個体番号とサンプリング日で表記した。個体 4-9 (緑) は 1 回のみのサンプリング。TuMV の RNTRa6 株(宿主はミヤガラシ *Rapistrum rugosum*)を外群とした。それ以外は、日本とアジア、ヨーロッパから得られたハクサンハタザオ以外の植物由来の TuMV 配列。(Honjo et al. 2020 を改変)

ンハタザオに対しては 44%が無病徴感染である (Kamitani et al. 2016)。プラスの一本鎖 RNA をゲノムにもち、この 3'末端に poly A 配列を持つことから、通常の RNA-seq 法でも検出可能である。

筆者らは、ハクサンハタザオとそれに感染する TuMV を対象に、自然生育地でのウイルス-宿主相互作用を明らかにするため、同じ個体から 3 年間週 1 回の RNA-seq データから TuMV の配列解析を行った。正確にはクローン繁殖で増えた別個体がパッチ状に広がっており (図 1A), その中から同じ個体由来のクローンをサンプリング対象とした。その結果, TuMV のゲノム配列は宿主個体ごとに異なる一方で、同一個体 (クローン) から得られる配列は 3 年間でほとんど変わらなかった。つまり、一度の感染イベントで感染した TuMV が 3 年にわたり入れ替わらず存在していることが分かった (図 1B)。

ウイルスの蓄積量は、新しく展開する葉で冬に抑制されるという季節変化があることが分かった (Honjo et al. 2020)。葉位ごとにウイルスの蓄積量を調べた結果、12月、4月、6月ではどの葉位でも同程度のウイルスが蓄積していたが、2月は上位葉でウイルスの蓄積量が下位葉の 1/10,000 の量であった (図 2)。感染個体を低温 (15°C/5°C, 明/暗) に移動すると新規展開葉の TuMV 量が減少し、再び暖温 (25°C/15°C, 明/暗) に移すと増加することから、冬は低温により新規に展開する葉でのウイルスの増殖を抑えていると考えられた。春の温度上昇とともに4月以降はウイルスが個体全体に同レベルまで増加し、新規展開葉にもウイルスが広がる。開花後に形成される空中ロゼットにもウイルスが広がることで、栄養繁殖を介してクローン個体に伝播する。

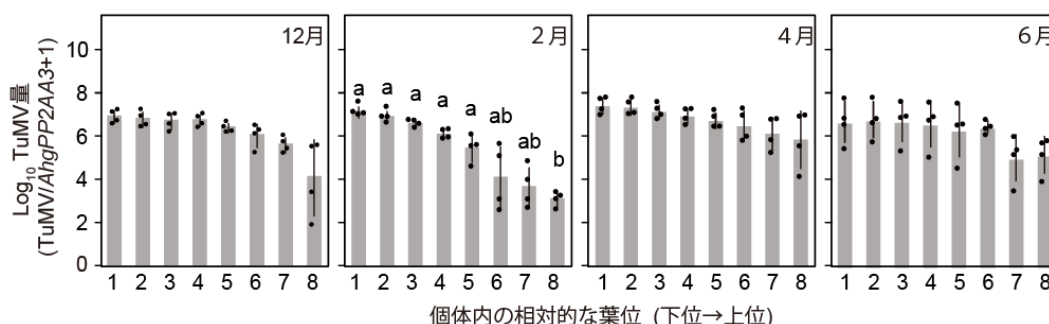


図 2. ハクサンハタザオ個体内の TuMV 量の分布の季節変化

葉の組織内の TuMV 量を葉位ごとに RT-qPCR で定量。最も気温が低い2月に上位葉 (若い葉) でウイルス量が少なかった。縦軸は log スケールのため、冬は下位葉に比べ上位葉のウイルス量は約 1/10000 に抑えられている。(Honjo et al. 2020 を改変)

4-3. 遺伝子発現応答の温度依存性

このような季節によるウイルス蓄積量の違いは、植物の遺伝子発現応答にどのような影響を与えるのだろうか。春分・夏至・秋分・冬至の4季節に感染個体と非感染個体から葉を採取し、トランスクリプトーム解析を行った。その結果、TuMV の感染に対するハクサンハタザオの遺伝子発現応答にも季節性があることが分かった (Honjo et al. 2020)。春分のサンプリング時の日平均気温は約 7°C で、解析に用いた葉では他の季節と比べてウイルス量が少ない個体が多くみられた。徐々に気温が上昇し始める早春であり、ウイルスが植物体内で全身へ拡がりつつある段階に相当すると考えられた。この時期に感染と非感染で発現差が検出されたのは 14 遺伝子で、いずれも感染個体で発現量が高く、病害応答や全身獲得抵抗性に関わる GO が有意にエンリッチしていた。具体的には、サリチル酸応答に関わる *AhgWRKY70*, *AhgNIMIN1* や *AhgPR2* が含まれていた。サリチル酸はウイルスをはじめ、細菌や真菌の感染でも誘導され病原体に対する防御として機能することが知られ、上述の遺伝

子はこの防御誘導の過程で発現が上がるということが知られている。一方、秋分にはこれらの遺伝子の有意な発現上昇は検出されず、ウイルス特異的な防御応答 RNA サイレンシングに関わる *AhgAGO1* や *AhgAGO2*, *AhgRDR6* など複数の遺伝子が発現上昇していた。これらの結果から、遺伝子発現レベルでの防御応答が季節によって異なることが明らかとなった。さらに、秋分には発現低下する遺伝子が多く検出され、例えばフラボノイド合成に関わる GO がエンリッチしていた。実際に、秋から冬に蓄積するアントシアニンが感染個体では全く見られない (図 3)。アントシアニンは、ストレスで誘導され、強光下での光合成装置や DNA 酸化傷害の緩和 (Zeng et al. 2010) や抗酸化の作用

(Ferdinando et al. 2012; Naing and Kim 2021) など複数の機能が報告されている。また、ウイルスに対しては、フラボノイドが感染力の抑制に効果があるという報告もある (French et al. 1991; French and Towers 1992; Inukai et al. 2023)。そのため、感染によりアントシアニンの蓄積阻害が、ハクサンハタザオにとって何らかの負の影響があるのか、今後の研究が期待される。一方、夏至と冬至には発現変動遺伝子が検出されなかったことから、ウイルス感染に対する植物の応答には季節性があることが示された。

4-4. 長期低温の影響

実際に、ハクサンハタザオへのウイルス感染は個体の成長にどの程度影響を与え、季節的な違いがあるのだろうか？感染個体と非感染個体を作成し、低温 (10/5°C, 明期/暗期) と暖温 (25°C/20°C, 明期/暗期) で栽培して、その応答を比較した。ウイルスの接種は、野外から採取した TuMV 感染個体の葉をバッファー内で破碎し、その澄み液を用いて行った。これを、カーボンの粉 (カーボランダム) で葉に軽く傷をつけながら塗布することで、感染個体を作成できる。非感染個体は、バッファーだけをカーボランダムで傷つけながら接種するという Mock 処理を行い作成した。

28 日間、暖温で育てた TuMV 接種個体では全身にウイルスが広がるとともに、モザイク病斑や壊死の病徴、クロロフィル量の減少が現れた。一方、低温で育てた個体ではウイルスの蓄積量は少なく、外見上の病徴や成長阻害も見られないことが分かった (Honjo et al. 2025, 図 4)。これは気温が低い冬季にウイルス量が抑えられることと矛盾しない。

次に、ウイルス感染による遺伝子発現への影響を 2 つの温度で比較した。同じ条件・サンプリング日に採取した感染個体と非感染個体の発現量を、全遺伝子で比較し、統計的に発現量が異なった遺伝子を TuMV による発現変動遺伝子とした。

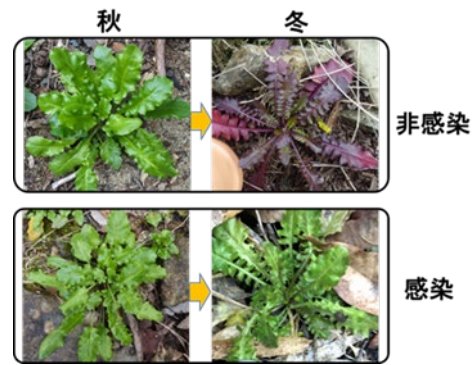


図 3. TuMV 感染個体と非感染個体のアントシアニン蓄積量の違い

ハクサンハタザオは、気温が下がる晩秋から冬にかけて赤紫色の色素アントシアニンを蓄積するが、TuMV に感染した個体ではアントシアニン蓄積が見られない。

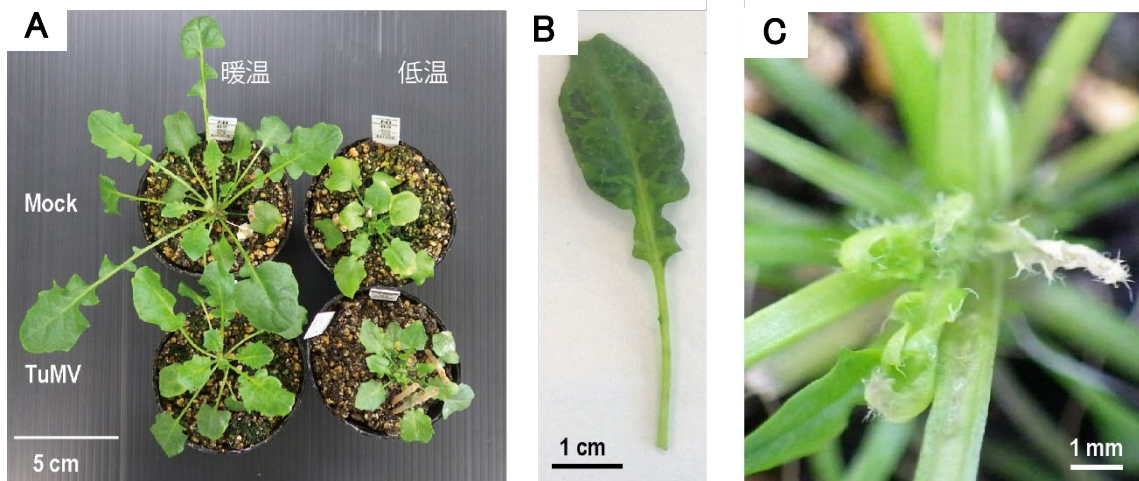


図4 TuMV接種個体と非接種個体(Mock)の接種28日目の様子

A. 接種後暖温で育てた個体と低温で育てた個体の様子。B. 暖温の接種個体で見られたモザイク病斑 C. 暖温の接種個体の新芽が白化した様子。低温下ではこのような病著は現れなかった (Honjo et al. 2025 を改変)

低温の感染初期（8日目）は光合成関連の遺伝子で発現低下がみられたが、28日には感染と非感染での発現差がなくなり、回復が見られた。また、ストレス応答関連の遺伝子の発現上昇が持続していることがGO解析から明らかになった。一方、暖温の感染個体では、28日目には光合成関連（*AhgLHCB* など）や防御関連遺伝子が発現低下し、全体として長期の感染で防御や光合成の発現応答が低下していることが示唆された。また、暖温でRNAサイレンシング経路の *AhgAGO1*, *AhgAGO2* において14日目以降に発現上昇がみられた。一方、低温では28日目まで発現誘導が見られなかった。この結果から、RNAサイレンシングが春分（日平均温度7℃）にはみられず、秋分（日平均温度20℃）に見られたのは、低温でウイルス感染による発現誘導性が低いことが1つの理由と考えられる。

野外の感染個体の多くは、感染から時間が経ち、接種28日後の遺伝子発現状態により近いと考えると、低温で発現変動遺伝子が少なく、一方暖温では防御や光合成機能関連の遺伝子で発現低下することは、野外での結果と矛盾しない。相互作用は必ずしも一定ではなく、冬のウイルス抑制時期があることで、宿主の病徴や成長の回復がみられ、結果としてウイルスが宿主を駆逐するような完全寄生的な関係ではなく、長期の感染系が成り立っているのではないかと考えている。

5. おわりに

本稿では、自然環境下において植物とウイルスの相互作用に季節性がみられることを紹介した。ブドウ園で Grapevine Red Blotch Virus (GRBV)の動態を調べた最近の研究では、ブドウの無病徴の個体からも比較的高濃度のウイルスが検出されたことや、6月に比べ10月にウイルス蓄積量が増加するという季節性を報告している (Kahl et al. 2022; Flasco et al. 2024)。他の植物とウイルスの相互作用にも季節性がある可能性が高く、今後の研究が期待される。

実際の野外では、植物は気温の変化だけでなく、日長の変化や、氷点下での凍結ストレス・真夏の高温ストレスなど、年間を通して多様な環境ストレスにさらされる。実験環境下では、ウイルス感染により植物のストレス抵抗性を弱める例がある一方、凍結・乾燥耐性が高まるという報告 (Xu et al. 2008) もある。したがって、自然環境下でウイルス感染が年間を通じて宿主のフィットネスに与える影響を評価することは重要である (de Andrés-Torán 2025)。さらに、生物間相互作用の観点からは、農業生態系においてウイルス感染植物には媒介昆虫がより誘引されたり、媒介昆虫の産子数が増える例が多く報告されている

(Eigenbrode et al. 2018; Mauck and Chesnais 2020) 一方で、筆者らはハクサンハタザオの自然生育地で TuMV に感染した個体で媒介昆虫アブラムシの数が少なく、ウイルスがアブラムシの産子数を抑えるという宿主への正の効果を与える例も発見している (Otsubo et al. 2025)。自然生態系の中でウイルスと植物が共進化の結果、どのような相互作用を構築しているのか、植物の生活史や生物間相互作用も含め、今後さらに研究が進展することが期待される。

謝辞

本稿で紹介した著者らの研究を行うにあたり、京都大学の工藤洋教授をはじめ、多くの方々のお世話になりました。またこれらの研究の一部は科研費日本学術振興会（課題番号 JP21H04977, JP24K09617, 26221106）と科学技術振興財団（課題番号 JPMJCR1501）、日本生命財団の助成を受けて行いました。この場を借りてお礼申し上げます。また、シンポジウムを企画し、執筆の機会をくださった奈良先端科学技術大学院大学の山口暢俊准教授と久保田茜助教に感謝申し上げます。

引用文献

- Amari K, Huang C, Heinlein M. (2021) Potential Impact of Global Warming on Virus Propagation in Infected Plants and Agricultural Productivity. *Front Plant Sci* 12: 649768. doi: 10.3389/fpls.2021.649768
- Chung BN, Choi KS, Ahn JJ, Joa JH, Do KS, Park KS. (2015) Effects of temperature on systemic infection and symptom expression of Turnip mosaic virus in Chinese cabbage (*Brassica campestris*). *Plant Pathol J.* 31: 363–370. doi: 10.5423/PPJ.NT.06.2015.0107
- Choi KS, Del Toro F, Tenllado F, Canto T, Chung BN. (2017) A Model to Explain Temperature Dependent Systemic Infection of Potato Plants by *Potato virus Y*. *Plant Pathol J.* 33: 206–211. doi: 10.5423/PPJ.NT.06.2016.0144
- de Andrés-Torán R, Maclot F, Mora MÁ, Fraile A, Pagán I, García-Arenal F. (2025) Effects of cucumber mosaic virus infection on *Arabidopsis thaliana* in wild populations: from mutualism to antagonism. *New Phytol.* doi:10.1111/nph.70640
- Eigenbrode SD, Bosque-Pérez NA, Davis TS. (2012) Insect-Borne Plant Pathogens and Their Vectors: Ecology, Evolution, and Complex Interactions. *Annu Rev Entomol* 63: 169–191. doi: 10.1146/annurev-ento-020117-043119

- Ferdinando MDi, Brunetti C, Fini A, Tattini M. (2012) Flavonoids as antioxidants in plants under abiotic stresses. In: Ahmad P, Prasad MNV, eds. Abiotic stress responses in plants: metabolism, productivity and sustainability. New York: Springer, 159–179.
- Flasco M, Hoyle V, Powell G, Seiter J, Wise A, Cieniewicz EJ, Fuchs M. (2024) Seasonal Variation in Grapevine Red Blotch Virus Titer in relation to symptom expression in vineyards. *Phytobiomes Journal* 8: 192-200. doi: 10.1094/PBIOMES-07-23-0076-R
- French CJ, Elder M, Leggett F, Ibrahim RK, Towers GH. (1991) Flavonoids inhibit infectivity of tobacco mosaic virus. *Can J Plant Pathol* 13: 1–6. doi: 10.1080/07060669109500959
- French CJ, Towers GH. (1992) Inhibition of infectivity of potato virus X by flavonoids. *Phytochemistry* 31, 3017–3020. doi:10.1016/0031-9422(92)83438-5
- Ghoshal B, Sanfaçon H. (2014) Temperature-dependent symptom recovery in *Nicotiana benthamiana* plants infected with tomato ringspot virus is associated with reduced translation of viral RNA2 and requires ARGONAUTE 1. *Virology* 456: 188–197. doi: 10.1016/j.virol.2014.03.026
- Hasiów-Jaroszewska B, Boezen D, Zwart MP. (2021) Metagenomic Studies of Viruses in Weeds and Wild Plants: A Powerful Approach to Characterise Variable Virus Communities. *Viruses*. 13: 1939. doi: 10.3390/v13101939
- Honjo MN, Emura N, Kawagoe T, Sugisaka J, Kamitani M, Nagano AJ, Kudoh H. (2020) Seasonality of interactions between a plant virus and its host during persistent infection in a natural environment. *ISME J* 14: 506–518. doi: 10.1038/s41396-019-0519-4
- Honjo MN, Emura N, Kamitani M, Kudoh H. (2025) Cold suppresses virus accumulation and alters the host transcriptomic response in the turnip mosaic virus–*Arabidopsis halleri* system. *Plant Cell Physiol* 66: 596–615. doi: 10.1093/pcp/pcaf010
- Honjo MN, Kudoh H. (2019) *Arabidopsis halleri*: a perennial model system for studying population differentiation and local adaptation. *AoB Plants* 11: plz076. doi: 10.1093/aobpla/plz076
- 本庄三恵, 大坪雅, 神谷麻梨, 工藤洋 (2025) 自然生態系における植物とウイルスとの相互作用. 植物感染生理談話会論文集 59: 80-88.
- Hull R (2014) *Plant Virology*. Amsterdam: Elsevier Academic Press
- Inukai T, Kim H, Matsunaga W, Masuta C. (2023) Battle for control of anthocyanin biosynthesis in two *Brassicaceae* species infected with turnip mosaic virus. *J Exp Bot* 74: 1659-1674. doi: 10.1093/jxb/erac502
- Judd WS, Campbell CS, Kellogg EA, Stevens PF, Donoghue MJ. (2002) *Plant Systematics: A Phylogenetic Approach*, -2nd Edition-. Sinauer, Massachusetts U.S.A.
- Jones RAC, Naidu RA. (2019) Global dimensions of plant virus diseases: current status and future perspectives. *Annu Rev Virol* 6: 387–409. doi: 10.1146/annurev-virology-092818-015606
- Jones RW, Jackson AO, Morris TJ. (1990) Defective-interfering RNAs and elevated temperatures inhibit replication of tomato bushy stunt virus in inoculated protoplasts. *Virology* 176: 539-545. doi: 10.1016/0042-6822(90)90024-1

- Jridi C, Martin JF, Marie-Jeanne V, Labonne G, Blanc S. (2006) Distinct viral populations differentiate and evolve independently in a single perennial host plant. *J Virol* 80: 2349-2357. doi: 10.1128/JVI.80.5.2349-2357.2006
- Kamitani M, Nagano AJ, Honjo MN, Kudoh H. (2016) RNA-Seq reveals virus-virus and virus-plant interactions in nature. *FEMS Microbiol Ecol* 92: fiw176. doi: 10.1093/femsec/fiw176
- Kamitani M, Nagano AJ, Honjo MN, Kudoh H (2017) First report of *Pelargonium zonate spot virus* from wild *Brassicaceae* plants in Japan. *J Gen Plant Pathol* 83: 329–332. doi: 10.1007/s10327-017-0727-6
- Kahl D, Lowery DT, Hart M, Úrbez-Torres JR. (2022) Seasonal dynamics and optimal diagnostics of Grapevine red blotch virus in a British Columbian vineyard, *Can J Plant Pathol* 44: 453-464. doi: 10.1080/07060661.2021.1993346
- Lebeurier G, Hirth L. (1966) Effect of elevated temperatures on the development of two strains of tobacco mosaic virus. *Virology* 29: 3385-3395. doi: 10.1016/0042-6822(66)90214-5
- Mauck KE, Chesnais Q. (2020) A synthesis of virus-vector associations reveals important deficiencies in studies on host and vector manipulation by plant viruses. *Virus Res* 285: 197957. doi: 10.1016/j.virusres.2020.197957
- May RM, Anderson RM. (1983) Epidemiology and genetics in the coevolution of parasites and hosts. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 219: 281-313. doi: 10.1098/rspb.1983.0075
- Nagano AJ, Honjo MN, Mihara M, Sato M, Kudoh H. (2015) Detection of plant viruses in natural environments by using RNA-Seq. *Methods Mol Biol* 1236: 89–98. doi: 10.1007/978-1-4939-1743-3_8
- Naing AH, Kim CK. (2021) Abiotic stress-induced anthocyanins in plants: Their role in tolerance to abiotic stresses. *Physiol Plant* 172: 1711-1723. doi: 10.1111/ppl.13373
- Ohsato S, Miyanishi M, Shirako Y. (2003) The optimal temperature for RNA replication in cells infected by Soil-borne wheat mosaic virus is 17 degrees C. *J Gen Virol* 84: 995-1000. doi: 10.1099/vir.0.19021-0
- Otsubo M, Nishio H, Kudoh H, Honjo MN. (2025) Turnip Mosaic Virus Infection in a Perennial *Arabidopsis* Reduces Aphid Fecundity in the Natural Environment. *Mol Ecol* 34: e70140. doi: 10.1111/mec.70140
- Pimentel D, Cerasale D, Stanley RC, Perlman R, Newman EM, Brent LC, Mullan A, Chang DTI. (2012) Annual vs. perennial grain production. *Agric Ecosyst Environ* 161: 1–9. doi: 10.1016/j.agee.2012.05.025
- Poppenwimer T, Mayrose I, DeMalach N. (2023) Revising the global biogeography of annual and perennial plants. *Nature* 624: 109–114. doi: 10.1038/s41586-023-06644-x
- Prendeville HR, Ye XH, Morris TJ, Pilson D. (2012) Virus infections in wild plant populations are both frequent and often unapparent. *Am J Bot* 99: 1033–42. doi: 10.3732/ajb.1100509
- Remold SK. (2002) Unapparent virus infection and host fitness in three weedy grass species. *J.Ecol.* 90: 967-977. doi: 10.1046/j.1365-2745.2002.00731.x

- Roossinck MJ. (2012) Plant virus metagenomics: biodiversity and ecology. *Annu Rev Genet.* 46: 359–69. doi: 10.1146/annurev-genet-110711-155600
- Roossinck MJ. (2015a) Metagenomics of plant and fungal viruses reveals an abundance of persistent lifestyles. *Front Microbiol* 5: 767. doi: 10.3389/fmicb.2014.00767
- Roossinck MJ. (2015b) Plants, viruses and the environment: Ecology and mutualism. *Virology* 479: 271–277. doi: 10.1016/j.virol.2015.03.041
- Roossinck MJ, García-Arenal F. (2015) Ecosystem simplification, biodiversity loss and plant virus emergence. *Curr Opin Virol.* 10: 56–62. doi: 10.1016/j.coviro.2015.01.005
- Szittya G, Silhavy D, Molnár A, Havelda Z, Lovas A, Lakatos L, Bánfalvi Z, Burgyán J. (2003) Low temperature inhibits RNA silencing-mediated defence by the control of siRNA generation. *EMBO J* 22: 633–640. doi: 10.1093/emboj/cdg74
- Velázquez K, Renovell A, Comellas M, Serra P, García ML, Pina JA, Navarro L, Moreno P, Guerri J. (2010) Effect of temperature on RNA silencing of a negative-stranded RNA plant virus: *Citrus psorosis virus*. *Plant Pathol.* 59: 982–990. doi: 10.1111/j.1365-3059.2010.02315.x
- Voinnet O. (2001) RNA silencing as a plant immune system against viruses. *Trends Genet* 17: 449–459. doi: 10.1016/s0168-9525(01)02367-8
- Xu P, Chen F, Mannas JP, Feldman T, Sumner LW, Roossinck MJ. (2008) Virus infection improves drought tolerance. *New Phyto* 180: 911–21. doi: 10.1111/j.1469-8137.2008.02627.x
- Zeng XQ, Chow WS, Su LJ, Peng XX, Peng CL. (2010) Protective effect of supplemental anthocyanins on *Arabidopsis* leaves under high light. *Physiol Plant* 138: 215–225. doi: 10.1111/j.1399-3054.2009.01316.x

植物－害虫間相互作用の分子基盤

上村 卓矢¹

¹ 東京理科大学先進工学部生命システム工学科
〒125-8585 東京都葛飾区新宿 6 丁目 3-1

Molecular mechanism underlying plant-herbivore interactions

Takuya Uemura¹

¹ Department of Biological Science and Technology, Faculty of Advanced Engineering,
Tokyo University of Science, Tokyo 125-8585, Japan

Keywords: effector, elicitor, plant-herbivore interaction, receptor

DOI: 10.24486/bsj-review.16c6.00290

1. はじめに

害虫等の植食者による食害を感知した植物は、二次代謝産物の生産等を介して害虫抵抗性を獲得する。さらに揮発性有機化合物（匂い）を放出し、天敵生物を誘引することで間接的に害虫を排除することもできる。このような匂いを介した植物－害虫天敵間相互作用は特異的であることが知られ、例えば寄生蜂であるコナガサムライコマユバチ (*Cotesia vestalis*) は、コナガ (*Plutella xylostella*) 幼虫に食害されたキャベツに誘引されるが、モンシロチョウ (*Pieris rapae*) 幼虫食害キャベツには誘引されない (Shiojiri et al. 2000)。また、シロイチモジヨトウ (*Spodoptera exigua*) 幼虫やアワヨトウ (*Mythimna separata*) 幼虫、ナミハダニ (*Tetranychus urticae*) によって食害されたリママメから放出される匂いブレンドは異なり、それぞれの天敵生物が特異的に誘引される (Ozawa et al. 2000)。このような事実は、植物が食害によって発生する機械傷のみならず害虫種特異的な食害パターンや分子シグナルを受容し害虫の存在を正確に認識していることを示唆している。近年の研究によって、害虫由来の防御応答誘導因子（エリシター）や、その受容認識およびシグナル伝達を担う植物分子が次々に発見され、それらの分子基盤が徐々に明らかになりつつある。また、これらの相互作用における害虫の特異的な植物適応機構も見出されつつある。本稿では、植物と昆虫の生存をかけた分子レベルでの緻密な攻防について、最新の知見を紹介しつつ筆者らの研究成果を交えながら概説したい。

2-1. 食害応答を駆動するエリシター

食害応答が誘導される大きな要素の一つに、食害時に施される機械的な傷害がある。傷害を感知した植物はダメージ関連分子パターン (Damage-associated molecular pattern, DAMP) と呼ばれるエリシターを自ら放出し、近隣もしくは遠方の細胞がこれらを受容することで傷害応答が誘導される。DAMP は細胞内および細胞壁由来の分子がプロセッシングされたものであり、代表的なものに Plant elicitor peptide (PEP) やシステミンといったペプチドや、オリゴガ

ラクツロン酸のような糖類、アデノシン三リン酸 (ATP) などが知られている (Ferrari et al. 2013; Huffaker et al. 2006; Pearce et al. 1991; Tanaka et al. 2014)。また, DAMP を細胞膜で特異的に認識する受容体様キナーゼ (Receptor-like kinase, RLK) も同定されている (Choi et al.

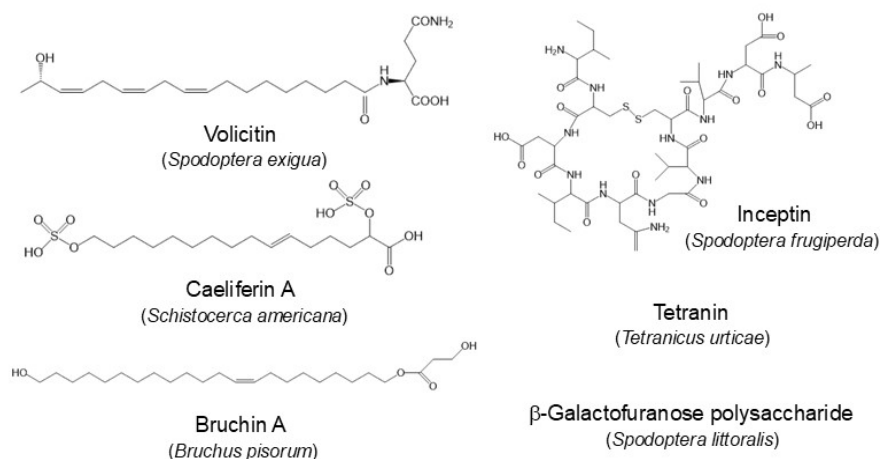


図 1. 害虫由来エリシター

括弧内はエリシターが発見された害虫種の学名を示す。

2014; Kohorn and Kohorn 2012; Wang et al. 2018; Yamaguchi et al. 2010; Yamaguchi et al. 2006)。RLK は細胞外領域にリガンド結合部位を, 細胞内領域にキナーゼドメインを有し, リン酸化シグナルを細胞内分子に伝達することで細胞内の防御応答を活性化する。DAMP 受容体の害虫抵抗性への寄与は明らかであるものの, 食害による物理的な刺激はさまざまな害虫種によって共通していることから, 害虫種特異的な食害応答を引き起こすには, 各害虫が特異的に持つエリシター等の関与が考えられる。

害虫由来のエリシターは, 1997 年に初めてその存在が報告された。トウモロコシ葉に機械傷とともにシロイチモジヨトウ幼虫から採取した吐き戻し液 (Oral secretion, OS) を塗布したところ, 食害時と同様の匂い成分が放出される。この応答は OS 内に含まれる volicitin (*N*-(17-hydroxylinolenoyl)-L-glutamine) と呼ばれる脂肪酸とアミノ酸の縮合物によるものであることが明らかにされた (Alborn et al. 1997)。その後, 様々な構造の害虫エリシターが発見されている。例えば, タンパク質/ペプチド型エリシターとして, ツマジロクサヨトウ (*Spodoptera frugiperda*) 腸内から単離された inceptin はササゲ由来 ATP 合成酵素のペプチド断片である (Schmelz et al. 2006)。また, ナミハダニ (*Tetranichus urticae*) が分泌する tetranin メンバーは嗜好性寄主であるインゲンマメと低嗜好性寄主であるキュウリにおいて異なる閾値の防御応答を引き起こすことができる (Iida et al. 2019; Endo et al. 2025)。

さらに糖型エリシターも同定されている。エジプトヨトウ (*Spodoptera littoralis*) 幼虫 OS からは構造未決定ではあるものの β -galactofuranose polysaccharide と思われる糖型エリシターが単離されている (Bricchi et al. 2013)。食餌としている植物の細胞壁は多量の糖類で構成されているため, このエリシターが害虫あるいは植物由来なのかは未解明である。

アメリカイナゴ (*Schistocerca americana*) から発見された脂肪酸型エリシターである caeliferin A は, トウモロコシやシロイヌナズナでは食害応答を誘導する一方で, ダイズやナスでは食害応答を誘導しない (Schmelz et al. 2009)。また, ボリシチンはトウモロコシ, ナス, ダイズといった限られた植物種にのみ食害応答を引き起こすことから (Schmelz et al. 2009), 害虫由来のエリシターが寄主植物の特異的な防御応答の誘導に重要であることは間違いない

であろう。一方で、DAMP によって害虫 OS による防御応答が促進される可能性も示唆されていることから (Shinya et al. 2018), 植物の害虫特異的な応答は機械傷応答と害虫由来分子 (分解/代謝酵素など) の両者によって複雑に制御されているものと考えられる。

2-2. 害虫エリシターの受容機構

害虫エリシターの受容認識においても、RLK を含めた受容体様タンパク質 (Receptor-like protein, RLP) が重要な役割を果たすと考えられている。RLP である、ササゲの *inceptin* 受容体 (INR) は、細胞内キナーゼドメインを持たないが、SOBIR1 という RLK と細胞膜上で相互作用するため、SOBIR1 によって細胞内へのリン酸化シグナルが伝達可能となると考えられる (Steinbrenner et al. 2020) (図 2)。INR は細胞外領域にロイシンに富んだ Leucine-rich repeat (LRR) 配列を有し、これがリガンドとの相互作用に重要な役割を果たす。最近、マメ科近縁種のゲノム解析から INR ホモログ内の LRR 配列のわずかな違いが *inceptin* 受容に重要であることが証明された (Snoeck et al. 2022)。

inceptin はマメ科植物の中でもササゲやインゲンマメなどの限られた植物種にのみ活性を示すが、ダイズの INR ホモログにはこの領域に変異があり、*inceptin* 非感受性である。おそらく、進化の過程でマメ科植物内のリガンド結合領域に少数の突然変異が続き、結果として *inceptin* 感受性植物と非感受性植物が生じたものと推測される。

ダイズでは、害虫由来の糖型エリシターを認識する HAK (HDS-associated receptor-like kinases) 遺伝子が同定されている。筆者らが単離した 2 種の HAK 遺伝子 (GmHAK1, GmHAK2) は、ハスモンヨトウ (*Spodoptera litura*) 幼虫 OS 応答を担う RLK として単離され、細胞外領域にはそれぞれ LRR 配列およびプロリンリッチ配列が存在する (Uemura et al. 2020)。ハスモンヨトウ OS を部分精製した結果、エリシター活性画分は高分子サイズ (推定 10 kDa 以上) の糖類が多く含まれていた。しかしながら、これらの HAK とエリシター画分の相互作用は検出されていないことから、HAK は共受容体として機能し、エリシター受容体の機能を補うことで食害応答の一端を担っているのかもしれない (図 2)。また、このような高分子の糖エリシ

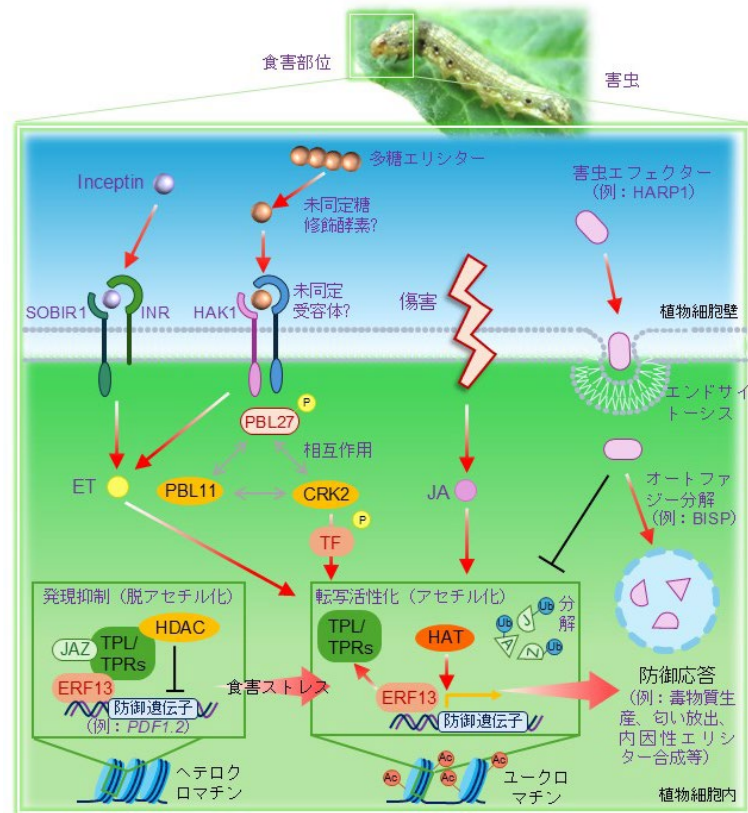


図 2. 害虫エリシターおよびエフェクターの作用機序

P:リン酸基, Ac:アセチル基, Ub:ユビキチン, TF:転写因子, ET:エチレン, JA:ジャスモン酸, HDAC:ヒストン脱アセチル化酵素, HAT:ヒストンアセチル化酵素。

ターが受容体に認識されるという前例がないことから、吐き戻されたエリシターが植物内で切断もしくは修飾といったプロセッシングを受けることで受容体に認識される可能性も考えられる。*inceptin* のケースとは異なり、この糖エリシターはダイズだけでなくアブラナ科のシロイヌナズナにおいても活性を有し、さらに *GmHAK1* のシロイヌナズナホモログ (*AtHAK*) もエリシター応答を担うことから、当該システムは植物種を超えて広く保存されている可能性が高く、広食性害虫の認識における共通のメカニズムとして機能しているのかもしれない。

食害応答における受容体以降の細胞内シグナル伝達因子についても徐々に明らかになりつつある。受容体様細胞質キナーゼである *PBL27* は *AtHAK1* と相互作用し、防御遺伝子である *PDF1.2* の発現誘導を担う (図 2) (Uemura et al. 2020)。*PBL27* は真菌エリシターであるキチンの受容体 *CERK1* とも相互作用し、リン酸化シグナルを活性化することで病害応答を制御するため (Shinya et al. 2014), *PBL27* は病害虫応答に関わる共通の細胞内キナーゼとしてはたらくのだろう。*PBL27* は、カルシウム依存性キナーゼ *CRK2* や他の *PBL* タンパク質とも相互作用することで (図 2), 細胞内における複雑なリン酸化ネットワークを形成し、エチレンシグナルおよびエチレン応答性転写因子 (*ERF13*) を介した *PDF1.2* の発現を誘導する (Desaki et al. 2024; Desaki et al. 2023; Miyamoto et al. 2019)。*INR/SOBIR1* システムや *AtHAK1/PBL27* システムにおいてもエチレン放出を制御することが認められており (Steinbrenner et al. 2020; Uemura et al. 2020), *DAMP* によって活性化される傷害ホルモンであるジャスモン酸 (*JA*) とエチレンシグナルの協調的なはたらきが、前述した, *DAMP* と害虫エリシターの相互作用の分子基盤である可能性が考えられる。

さらに近年、抵抗性遺伝子の発現にはヒストン修飾のようなエピジェネティック制御機構も重要な役割を果たすことが報告されている。転写リプレッサーである *TOPLESS* (*TPL*) および *TPL-related* (*TPR*) タンパク質はヒストン脱アセチル化酵素 *HDA6* と相互作用し, *PDF1.2* および *ERF13* 領域のヒストンを脱アセチル化状態に保つことで、定常時はその発現を抑制しているが、食害時には当領域のヒストンアセチル化が促され、転写が活性化されるモデルが提唱された (Yusuf et al. 2025)。興味深いのは、このエピジェネティック制御がハスモンヨトウ幼虫 *OS* 処理の 2 時間後という非常に早い時点で観測されたという点であり、これは食害 (害虫エリシター) を感知した植物が、クロマチン構造を迅速かつダイナミックに変化させることでゲノムレベルで防御応答を即座に誘導するメカニズムを有することを示唆している。

2-3. エフェクターを利用した害虫の生存戦略

植物の防御応答に対して、害虫による寄主植物への適応能力も進化し続けている。そのため、植物の防御応答を抑制する害虫由来因子はエフェクターと呼ばれ、食害時に寄主植物側に放出され、寄主のシグナル伝達経路への干渉や活性酸素産生を阻害し、害虫の適応力を高めることができる。近年、トランスクリプトーム情報へのアクセスが容易になったことで、吸汁性害虫種の唾液腺発現プロファイルからタンパク質型エフェクターの発見が相次いでいる。例えば、アブラムシ (*Macrosiphum euphorbiae*) の唾液腺で発現する *Me10* は、トマトの細胞内において 14-3-3 タンパク質と相互作用し、リン酸化シグナルを阻害している (Atamian et al. 2013; Chaudhary et al. 2019)。咀嚼性害虫種からのエフェクター単離例は依然として少な

いが、最近 HARP1 と呼ばれるエフェクタータンパク質がオオタバコガ (*Helicoverpa armigera*) から単離され、植物のエンドサイトーシス機構を介して細胞内に取り込まれると、JA シグナルのリプレッサーである JAZ タンパク質と相互作用することが見出された (Chen et al. 2019; Yan et al. 2023)。害虫抵抗性遺伝子の発現には JAZ の分解が必須であるが、HARP1 はそれを阻害し JAZ は分解から免れる。同様に、JA 応答性の防御遺伝子発現を制御する MYC 転写因子と相互作用する HAS1 もオオタバコガから単離され、MYC の転写活性化を阻害することが明らかにされている (Chen et al. 2023)。

これらのエフェクターに対する植物の防御システムも知られている。例えば、オートファジー機構を用いて害虫エフェクターの分解を促進するモデルがトビイロウンカ (*Nilaparvata lugens*) 食害イネで示されている (Guo et al. 2023)。害虫エフェクターの作用は寄主植物の間接防衛機構にも及び、カイコ (*Bombyx mori*) 幼虫の吐糸口から放出される脱水酵素 BmFHD は、天敵生物の誘引に利用される「みどりの香り」成分の中間産物を変換することができる。これにより匂いの放出を制限し、天敵生物であるヤドリバエ (*Zenillia dolosa*) による寄生を回避することができるのである (Takai et al. 2018)。

3-1. おわりに

1997 年に volicitin が害虫エリシターとして単離されてから 20 年以上が経過し、植物－害虫間相互作用に関与する分子機構が解かれつつある。本稿では紹介しきれなかったが、害虫の卵や糞だけでなく、腸内細菌にもエリシターおよびエフェクター活性が見出されており (Ray et al. 2016; Reymond 2013; Yamasaki et al. 2021; Zeng et al. 2023)，このことから、植物と害虫は内外のさまざまな因子を利用して、食う喰われるの関係を構築していることが垣間見れる。しかしながら、当該相互作用は植物種と害虫種の特異的な関係性によって限定的な種間でのみ成り立っているケースも多く、未だに共通の分子モデルを打ち出すには至っていない。特に、非モデル植物における報告例が多く、当該相互作用における遺伝子機能の決定は容易ではない。今後は植物と昆虫両者の形質転換技術の開発およびその習得が現状打破の鍵となるかもしれない。また、植物－害虫間相互作用研究によって蓄積された基礎的知見は、生態系システムの理解だけに留まらず、農業分野への応用にも繋がるだろう。害虫による世界の農作物被害額は年間 700 億ドルとも試算されており、今後地球温暖化が加速することで害虫の生息域が拡大し、その被害はより深刻なものになると想定される (Bradshaw et al. 2016)。さらに重度の農薬使用によって環境への負荷や人体への健康への影響も懸念されており、抗虫活性成分や天敵生物の誘引に用いられる匂い物質を活用し、実用化を目指すことで害虫に強い持続可能な減農薬型作物生産体制の構築にも繋がることを期待したい。

謝辞

本稿の執筆にあたり、ご助言をくださった有村源一郎博士 (東京理科大学) に感謝申し上げます。本稿の作成は科学研究費補助金 (研究課題番号: 24H02134, 24K18197)、東京理科大学研究支援制度による助成の下で行われました。

引用文献

- Alborn HT, Turlings TCJ, Jones TH, Stenhagen G, Loughrin JH, Tumlinson JH (1997) An Elicitor of Plant Volatiles from Beet Armyworm Oral Secretion. *Science* 276: 945-949. doi: 10.1126/science.276.5314.945
- Atamian HS, Chaudhary R, Cin VD, Bao E, Girke T, Kaloshian I (2013) In Planta Expression or Delivery of Potato Aphid *Macrosiphum euphorbiae* Effectors Me10 and Me23 Enhances Aphid Fecundity. *Molecular Plant-Microbe Interactions®* 26: 67-74. doi: 10.1094/mpmi-06-12-0144-fi
- Bradshaw CJA, Leroy B, Bellard C, Roiz D, Albert C, Fournier A, Barbet-Massin M, Salles J-M, Simard F, Courchamp F (2016) Massive yet grossly underestimated global costs of invasive insects. *Nature Communications* 7: 12986. doi: 10.1038/ncomms12986
- Bricchi I, Occhipinti A, Berteaux CM, Zebelo SA, Brillada C, Verrillo F, De Castro C, Molinaro A, Faulkner C, Maule AJ, Maffei ME (2013) Separation of early and late responses to herbivory in *Arabidopsis* by changing plasmodesmal function. *The Plant Journal* 73: 14-25. doi: 10.1111/j.1365-313X.2012.05103.x
- Chaudhary R, Peng H-C, He J, MacWilliams J, Teixeira M, Tsuchiya T, Chesnais Q, Mudgett MB, Kaloshian I (2019) Aphid effector Me10 interacts with tomato TFT7, a 14-3-3 isoform involved in aphid resistance. *New Phytologist* 221: 1518-1528. doi: 10.1111/nph.15475
- Chen C-Y, Liu Y-Q, Song W-M, Chen D-Y, Chen F-Y, Chen X-Y, Chen Z-W, Ge S-X, Wang C-Z, Zhan S, Chen X-Y, Mao Y-B (2019) An effector from cotton bollworm oral secretion impairs host plant defense signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116: 14331-14338. doi:10.1073/pnas.1905471116
- Chen X, Liu Y-Q, Wu M-N, Yan L, Chen C-Y, Mu Y-P, Liu Y-J, Wang M-Y, Chen X-Y, Mao Y-B (2023) A highly accumulated secretory protein from cotton bollworm interacts with basic helix-loop-helix transcription factors to dampen plant defense. *New Phytologist* 237: 265-278. doi: 10.1111/nph.18507
- Choi J, Tanaka K, Cao Y, Qi Y, Qiu J, Liang Y, Lee SY, Stacey G (2014) Identification of a Plant Receptor for Extracellular ATP. *Science* 343: 290-294. doi:10.1126/science.343.6168.290
- Desaki Y, Kato T, Nemoto K, Nozawa A, Uemura T, Ninomiya N, Sawasaki T, Arimura G-i (2024) Intricate intracellular kinase network regulates the *Spodoptera litura*-derived elicitor response signaling in *Arabidopsis*. *Journal of Plant Research* 138: 95-103. doi: <https://doi.org/10.1007/s10265-024-01586-5>
- Desaki Y, Morishima M, Sano Y, Uemura T, Ito A, Nemoto K, Nozawa A, Sawasaki T, Arimura G-i (2023) Cytoplasmic Kinase Network Mediates Defense Response to *Spodoptera litura* in *Arabidopsis*. *Plants* 12: 1747. doi: <https://doi.org/10.3390/plants12091747>
- Endo Y, Tanka M, Uemura T, Tanimura K, Desaki Y, Ozawa R, Bonzano S, Maffei M, Shinya T, Galis I, Arimura G-I. Spider mite tetranins elicit different defense responses in different host habitats. *The Plant Journal* 121: e70046. doi: 10.1111/tpj.70046

- Ferrari S, Savatin DV, Sicilia F, Gramegna G, Cervone F, De Lorenzo G (2013) Oligogalacturonides: plant damage-associated molecular patterns and regulators of growth and development. *Frontiers in Plant Science* 4: 49. doi: 10.3389/fpls.2013.00049
- Guo J, Wang H, Guan W, Guo Q, Wang J, Yang J, Peng Y, Shan J, Gao M, Shi S, Shangguan X, Liu B, Jing S, Zhang J, Xu C, Huang J, Rao W, Zheng X, Wu D, Zhou C, Du B, Chen R, Zhu L, Zhu Y, Walling LL, Zhang Q, He G (2023) A tripartite rheostat controls self-regulated host plant resistance to insects. *Nature* 618: 799-807. doi: 10.1038/s41586-023-06197-z
- Huffaker A, Pearce G, Ryan CA (2006) An endogenous peptide signal in *Arabidopsis* activates components of the innate immune response. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103: 10098-10103. doi: 10.1073/pnas.0603727103
- Iida J, Desaki Y, Hata K, Uemura T, Yasuno A, Islam M, Maffei ME, Ozawa R, Nakajima T, Galis I, Arimura G-i (2019) Tetranins: new putative spider mite elicitors of host plant defense. *New Phytologist* 224: 875-885. doi: 10.1111/nph.15813
- Kohorn BD, Kohorn SL (2012) The cell wall-associated kinases, WAKs, as pectin receptors. *Frontiers in Plant Science* 3: 88. doi: 10.3389/fpls.2012.00088
- Miyamoto T, Uemura T, Nemoto K, Daito M, Nozawa A, Sawasaki T, Arimura G-i (2019) Tyrosine Kinase-Dependent Defense Responses Against Herbivory in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science* 10: 776. doi: 10.3389/fpls.2019.00776
- Ozawa R, Arimura G-i, Takabayashi J, Shimoda T, Nishioka T (2000) Involvement of Jasmonate- and Salicylate-Related Signaling Pathways for the Production of Specific Herbivore-Induced Volatiles in Plants. *Plant and Cell Physiology* 41: 391-398. doi: 10.1093/pcp/41.4.391
- Pearce G, Strydom D, Johnson S, Ryan CA (1991) A Polypeptide from Tomato Leaves Induces Wound-Inducible Proteinase Inhibitor Proteins. *Science* 253: 895-897. doi: 10.1126/science.253.5022.89
- Ray S, Basu S, Rivera-Vega LJ, Acevedo FE, Louis J, Felton GW, Luthe DS (2016) Lessons from the Far End: Caterpillar FRASS-Induced Defenses in Maize, Rice, Cabbage, and Tomato. *Journal of Chemical Ecology* 42: 1130-1141. doi: 10.1007/s10886-016-0776-x
- Reymond P (2013) Perception, signaling and molecular basis of oviposition-mediated plant responses. *Planta* 238: 247-258. doi: 10.1007/s00425-013-1908-y
- Schmelz EA, Carroll MJ, LeClere S, Phipps SM, Meredith J, Chourey PS, Alborn HT, Teal PEA (2006) Fragments of ATP synthase mediate plant perception of insect attack. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103: 8894-8899. doi: 10.1073/pnas.0602328103
- Schmelz EA, Engelberth J, Alborn HT, Tumlinson JH, Teal PEA (2009) Phytohormone-based activity mapping of insect herbivore-produced elicitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106: 653-657. doi:10.1073/pnas.0811861106

- Shinya T, Yamaguchi K, Desaki Y, Yamada K, Narisawa T, Kobayashi Y, Maeda K, Suzuki M, Tanimoto T, Takeda J, Nakashima M, Funama R, Narusaka M, Narusaka Y, Kaku H, Kawasaki T, Shibuya N (2014) Selective regulation of the chitin-induced defense response by the Arabidopsis receptor-like cytoplasmic kinase PBL27. *The Plant Journal* 79: 56-66.
- Shinya T, Yasuda S, Hyodo K, Tani R, Hojo Y, Fujiwara Y, Hiruma K, Ishizaki T, Fujita Y, Saijo Y, Galis I (2018) Integration of danger peptide signals with herbivore-associated molecular pattern signaling amplifies anti-herbivore defense responses in rice. *The Plant Journal* 94: 626-637. doi: 10.1111/tpj.12535
- Shiojiri K, Takabayashi J, Yano S, Takafuji A (2000) Flight response of parasitoids toward plant-herbivore complexes: A comparative study of two parasitoid-herbivore systems on cabbage plants. *Applied Entomology and Zoology* 35: 87-92. doi: <https://doi.org/10.1303/aez.2000.87>
- Snoeck S, Abramson BW, Garcia AGK, Egan AN, Michael TP, Steinbrenner AD (2022) Evolutionary gain and loss of a plant pattern-recognition receptor for HAMP recognition. *eLife* 11: e81050. doi: 10.7554/eLife.81050
- Steinbrenner AD, Muñoz-Amatriaín M, Chaparro AF, Aguilar-Venegas JM, Lo S, Okuda S, Glauser G, Dongiovanni J, Shi D, Hall M, Crubaugh D, Holton N, Zipfel C, Abagyan R, Turlings TCJ, Close TJ, Huffaker A, Schmelz EA (2020) A receptor-like protein mediates plant immune responses to herbivore-associated molecular patterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 117: 31510-31518. doi: 10.1073/pnas.2018415117
- Takai H, Ozawa R, Takabayashi J, Fujii S, Arai K, Ichiki RT, Koeduka T, Dohra H, Ohnishi T, Taketazu S, Kobayashi J, Kainoh Y, Nakamura S, Fujii T, Ishikawa Y, Kiuchi T, Katsuma S, Uefune M, Shimada T, Matsui K (2018) Silkworms suppress the release of green leaf volatiles by mulberry leaves with an enzyme from their spinnerets. *Scientific Reports* 8: 11942. doi: 10.1038/s41598-018-30328-6
- Tanaka K, Choi J, Cao Y, Stacey G (2014) Extracellular ATP acts as a damage-associated molecular pattern (DAMP) signal in plants. *Frontiers in Plant Science* 5: 446. doi: 10.3389/fpls.2014.00446
- Uemura T, Hachisu M, Desaki Y, Ito A, Hoshino R, Sano Y, Nozawa A, Mujiono K, Galis I, Yoshida A, Nemoto K, Miura S, Nishiyama M, Nishiyama C, Horito S, Sawasaki T, Arimura G-i (2020) Soy and Arabidopsis receptor-like kinases respond to polysaccharide signals from *Spodoptera* species and mediate herbivore resistance. *Communications Biology* 3: 224. doi: <https://doi.org/10.1038/s42003-020-0959-4>
- Wang L, Einig E, Almeida-Trapp M, Albert M, Fliegmann J, Mithöfer A, Kalbacher H, Felix G (2018) The systemin receptor SYR1 enhances resistance of tomato against herbivorous insects. *Nature Plants* 4: 152-156. doi: <https://doi.org/10.1038/s41477-018-0106-0>
- Yamaguchi Y, Huffaker A, Bryan AC, Tax FE, Ryan CA (2010) PEPR2 Is a Second Receptor for the Pep1 and Pep2 Peptides and Contributes to Defense Responses in Arabidopsis. *The Plant Cell* 22: 508-522. doi: <https://doi.org/10.1105/tpc.109.068874>

- Yamaguchi Y, Pearce G, Ryan CA (2006) The cell surface leucine-rich repeat receptor for AtPep1, an endogenous peptide elicitor in *Arabidopsis*, is functional in transgenic tobacco cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103: 10104-10109. doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.0603729103>
- Yamasaki Y, Sumioka H, Takiguchi M, Uemura T, Kihara Y, Shinya T, Galis I, Arimura G-i (2021) Phytohormone-dependent plant defense signaling orchestrated by oral bacteria of the herbivore *Spodoptera litura*. *New Phytologist* 231: 2029-2038. doi: 10.1111/nph.17444
- Yan Z-W, Chen F-Y, Zhang X, Cai W-J, Chen C-Y, Liu J, Wu M-N, Liu N-J, Ma B, Wang M-Y, Chao D-Y, Gao C-J, Mao Y-B. (2023) Endocytosis-mediated entry of a caterpillar effector into plants is countered by Jasmonate. *Nature Communications* 14: 6551. doi: <https://doi.org/10.1038/s41467-023-42226-1>
- Yusuf A, Wakaya K, Sakamoto T, Uemura T, Okamura K, Ramadan A, Nozawa A, Suzuki T, Inui Y, Matsunaga S, Sawasaki T, Arimura G-I (2025) Histone Modification-Dependent Transcriptional Regulation of Defence Genes in Early Response of *Arabidopsis* to *Spodoptera litura* Attack. *Plant, Cell & Environment* 48: 3257-3268. doi: <https://doi.org/10.1111/pce.15345>
- Zeng J, Ye W, Hu W, Jin X, Kuai P, Xiao W, Jian Y, Turlings TCJ, Lou Y (2023) The N-terminal subunit of vitellogenin in planthopper eggs and saliva acts as a reliable elicitor that induces defenses in rice. *New Phytologist* 238: 1230-1244. doi: 10.1111/nph. 1879

H3K27me3 を除去する JMJ による植物の発生と環境応答の制御機構

岡本 彩伽, 石山 凜, 山口 暢俊

奈良先端科学技術大学院大学 先端科学技術研究科 バイオサイエンス領域
〒630-0192 奈良県生駒市高山町 8916-5

Regulation of Plant Development and Environmental Response through the Removal of H3K27me3 Mediated by JMJ Proteins

Sayaka Okamoto, Rin Ishiyama, Nobutoshi Yamaguchi

Nara Institute of Science and Technology, Graduate School of Science and Technology,
Division of Biosciences
8916-5 Takayama, Ikoma, Nara, 630-0192, Japan

Keywords: Arabidopsis, Epigenetics, Histone demethylases, H3K27me3, JUMONJI

DOI: 10.24487/bsj-review.16c7.00290

1. はじめに

植物の発生や環境応答における遺伝子発現に極めて重要な役割を果たすのがクロマチンである (Eccleston et al. 2013; Bruneau et al. 2019)。クロマチンはゲノム DNA、ヒストン、補助タンパク質から構成され、約 150 塩基対の DNA が 8 量体のヒストンタンパク質複合体に巻き付いたヌクレオソームが連なった構造をしている (Vergara et al. 2017; van Steensel et al. 2019)。ヒストンは C 末端のコア構造と N 末端の尾部で構成され、N 末端の尾部は様々な翻訳後修飾を受けやすい部分である。アセチル化、メチル化、ユビキチン化、リン酸化などの修飾は、クロマチン構造を変化させ、遺伝子発現に影響を与える。

ヒストン修飾の一つであるヒストン H3 リジン 27 のトリメチル化 (H3K27me3) は、発現が抑制されている遺伝子に多く見られる (Xiao and Wagner 2015; Xiao et al. 2016)。H3K27me3 の導入 (メチル化) は、動植物間で高度に保存されている構成因子が機能するポリコーム複合体 2 (PRC2) が行う。一方、H3K27me3 の除去 (脱メチル化) は、Jumonji C (JmjC) ドメインを持つ脱メチル化酵素が行っている (Crevillén 2020)。しかしながら、H3K27me3 を除去する脱メチル化酵素についての研究はまだ限られている。ここ 10 年ほどで、シロイヌナズナにおける H3K27me3 の除去に関する研究が進展している。これまでに、5 つの JMJ タンパク質 EARLY FLOWERING 6 (ELF6) /JUMONJI DOMAIN-CONTAINING PROTEIN11 (JMJ11), RELATIVE OF ELF6 (REF6) /JMJ12, JMJ13, JMJ30, JMJ32 が H3K27me3 脱メチル化酵素として同定されている (Lu et al. 2011a; Crevillén et al. 2014; Gan et al. 2014; Cui et al. 2016; Yan et al. 2018)。本稿では、これらの 5 つの JMJ タンパク質が、どのような構造の特徴を持ち、どのように遺伝子に働きかけ、どのような生命現象を制御するかを概説する。

2. H3K27me3 を脱メチル化する JMJ タンパク質の構造

JmjC ドメインを持つ脱メチル化酵素は 14 のサブファミリーに分類されている。クラミドモナスやボルボックスなどの緑藻類には、このファミリーのメンバーが 2 つしか含まれていない。しかし、陸上植物では 10 以上のメンバーが確認されている。このことから、JMJ タンパク質が植物の陸上への適応や進化に重要な役割を果たしたと考えられる (Qian et al. 2015)。シロイヌナズナには、21 種類の JMJ タンパク質が存在する (Lu et al. 2008)。これら全てのメンバーの機能が完全に解明されているわけではないが、H3K9me3, H3K36me3, H3K4me3, H3K27me3 などの特定のヒストン修飾を脱メチル化する酵素として働くことがわかっている。現在までに H3K27me3 の除去に関わることがわかっているのは、ELF6, REF6, JMJ13, JMJ30, JMJ32 である。ELF6, REF6, JMJ13 は同じクレードに、JMJ30, JMJ32 は他の 3 つとは違うクレードに分類されている (Lu et al. 2008; Qian et al. 2015)。

ELF6, REF6, JMJ13 タンパク質は、陸上植物には存在するが緑藻類には存在しない植物特異的 KMD4 サブファミリーに属している (Lu et al. 2008; Qian et al. 2015)。REF6 は JmjN, JmjC, C2H2 型ジンクフィンガー (ZnF) ドメインを持つ (図 1)。また、REF6 タンパク質は、ZnF ドメインを 4 つタンデムに持つという特徴がある。REF6 はこの ZnF ドメインを介して、特異的な DNA 配列を認識し、H3K27me3 脱メチル化酵素として機能する (Cui et al. 2016; Li et al. 2016; Tian et al. 2020)。REF6 の ZnF ドメインが標的遺伝子の 1 つである *NAC004* 遺伝子に結合すると、水素結合、静電相互作用、疎水性相互作用などの相互作用が形成されて、結合が強くなる。

ELF6 は REF6 に最も近いホモログである。この 2 つのタンパク質は高い配列類似性を有している (図 1)。しかし、ELF6 が REF6 と同様の機構で DNA を認識しているのかは不明である。最近の研究では、REF6 と ELF6 は H3K27me3 と H3K27me1 の恒常性維持において異なる役割を果たすことが報告されている (Antunez-Sanchez et al. 2020)。その研究の中で、ELF6 は REF6 に比べて制御する遺伝子数が多いことが明らかにされている。そのため、標的遺伝子を制御する分子基盤も一部は異なると考えられる。

JMJ13 も REF6 や ELF6 と同様に KMD4 サブファミリーに属し、*in vitro* および *in vivo* で H3K27me3 を除去する機能を持つことがわかっている。しかし、JMJ13 は C 末端に ZnF ドメインを持たない。JMJ13 は、触媒ドメイン (JMJ13CD) を持っており (図 1)、この JMJ13CD により H3K27me3 ペプチドを認識する (Zheng et al. 2019)。JMJ13 と H3K27me3 ペプチドの相互作用は、ヒストン H3 アルギニン 26 とヒストン H3 プロリン 30 の間という極めて限定された領域で起こる。同様のヒストン修飾の認識は、他の JMJ タンパク質でも起こる可能性がある。

JMJ30, JMJ32, およびその近縁ホモログである JMJ31 は、JmjC ドメインのみのグループに属する。JMJ30 と JMJ32 が、どのように DNA と相互作用をするかや、ヒストン修飾をどのように認識するかについてはほとんどわかっていない。さらに、JMJ30 の活性は H3K27me3 に加えて、H3K9me3, H3K36me3 にも影響を与える。JMJ30 の生化学的機能を正確に理解するために、さらなる研究の進展が待たれる。

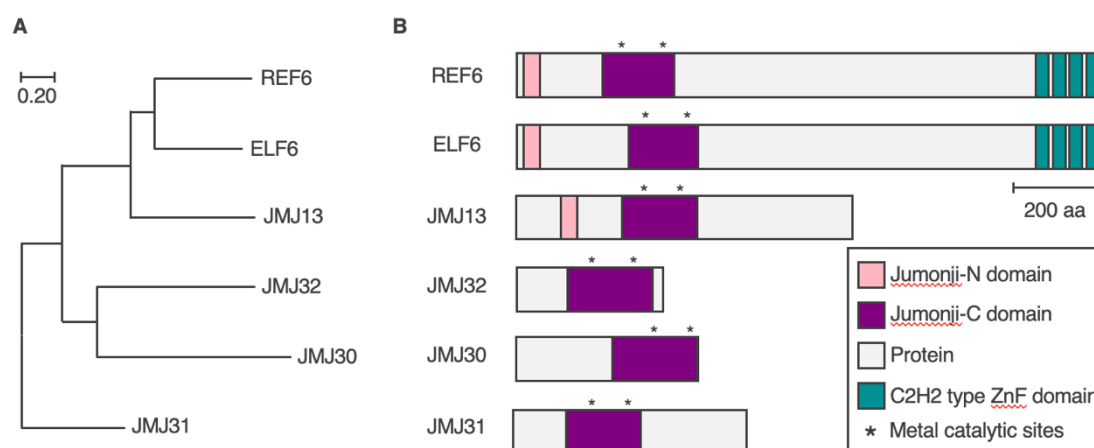


図 1. シロイヌナズナの H3K27me3 ヒストン脱メチル化酵素の系統樹とドメイン構造

(A) シロイヌナズナにおける H3K27me3 ヒストン脱メチル化酵素の系統樹。REF6, ELF6, JMJ13 は同じクレードに, JMJ30 と JMJ32 も同じクレードに属する。

(B) シロイヌナズナにおける JMJ タンパク質のドメイン構造。Jumonji-N ドメイン, Jumonji-C ドメイン, タンパク質, および C2H2 型亜鉛フィンガー (ZnF) ドメインの位置をそれぞれピンク, 紫, 灰色, 緑で示す。金属触媒部位はアスタリスクで示す。スケールバー = 200 アミノ酸。

3. H3K27me3 のヒストン脱メチル化酵素である JMJ の標的に対する結合様式

JMJ タンパク質が H3K27me3 を除去する分子基盤を理解するためには, クロマチンとの相互作用の様式を明らかにすることが必要不可欠である。現時点では, REF6 とクロマチンの相互作用様式の研究がよく進んでいる。上述した REF6 が持つ ZnF を介した標的の認識, JMJ13 による H3K27me3 ペプチドの認識以外に, 他の因子とのタンパク質間相互作用によるリクルートの様式が報告されている。ここでは, 主に研究が進行している REF6 の標的の認識の多様性について述べる。

REF6 は組織特異的な転写因子と相互作用して, 標的を認識することがわかっている。例えば, REF6 は MADS-box 転写因子である SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1 (SOC1) や, 植物特有の転写因子である SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN LIKE 15 (SPL15) などとタンパク質相互作用して, 複合体によって標的を認識する (Hyun et al. 2016)。JMJ が転写因子と相互作用する例は, 他の JMJ にも広くみられる標的制御様式であると言える。例えば, ELF6 はブラシノステロイドのシグナル伝達を制御する転写因子 BRI1-EMS-SUPPRESSOR 1 (BES1) と相互作用する (Yu et al. 2008)。また, JMJ30 は EARLY FLOWERING MYB PROTEIN (EFM) や AUXIN RESPONSE FACTOR (ARF) と物理的に相互作用する (Yan et al. 2014; Lee et al. 2018)。このように, 相互作用する因子は異なるものの, ヒストン脱メチル化酵素である JMJ が標的を認識する際には, 転写因子との相互作用が非常に重要であることがわかる。

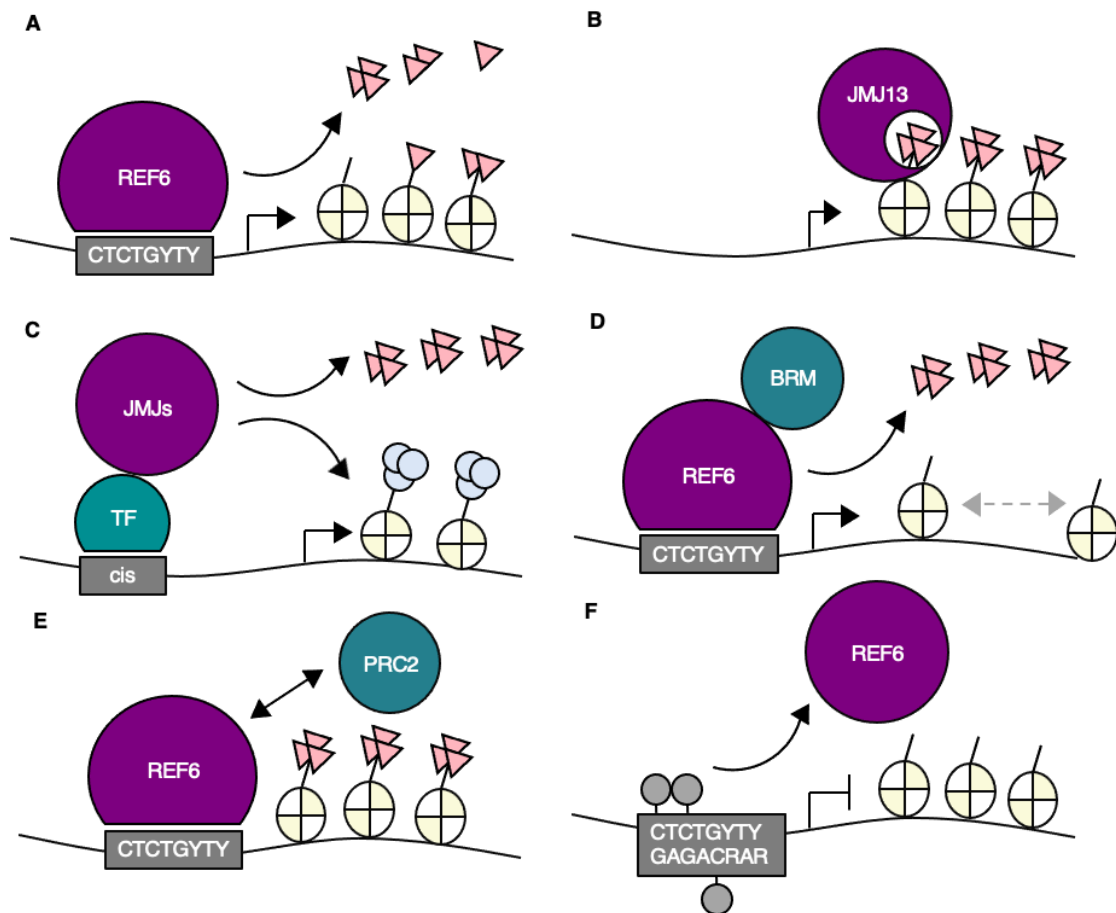


図2. シロイヌナズナの H3K27me3 ヒストン脱メチル化酵素による遺伝子発現制御

(A) REF6 は、CTCTGYTY (Y は C または T) DNA モチーフを認識することで、H3K27me1/2/3 を脱メチル化する。(B) JMJ13 は H3K27me3 ペプチドを認識する。(C) JMJ タンパク質は転写因子と相互作用し、標的にリクルートされる。(D) REF6 は BRAHMA (BRM) と相互作用し、ヌクレオソームの位置を決める。(E) REF6 と PRC2 はクロマチン上で拮抗的に働く。(F) CTCTGYTY モチーフの DNA がメチル化された場合、REF6 の認識能力は低下する。H3K27me3 はピンクの三角形で、H3K9ac は薄い青の丸で、DNA メチル化は灰色の丸で示した。

免疫沈降および質量分析法の組み合わせにより、REF6 の相互作用因子として、SWI/SNF 型クロマチンリモデリング ATPase である BRAHMA (BRM) がみついている (Li et al. 2016)。REF6 と BRM は、CTCTGYTY モチーフの周辺に結合のピークがある。REF6 の機能に依存して BRM の標的遺伝子座へリクルートされる。一方で、REF6 は自身のターゲティングに BRM の活性を必要とはしない。そのため、REF6 は CTCTGYTY モチーフを含むクロマチンに直接結合し、その後 BRM をリクルートすると考えられる (図2)。

REF6/BRM と PRC2 は、標的遺伝子の発現を拮抗的に制御する (Bezhani et al. 2007; Lu et al. 2011a; Wu et al. 2012; Li et al. 2015)。多くの場合、拮抗作用はクロマチン上でモチーフを

競合することで制御される場合が多い (Zhu et al. 2020)。しかし、PRC2 は TELO ボックスや GAGA モチーフなどに結合する (Hecker et al. 2015; Xiao et al. 2017; Zhou et al. 2018)。このように、それぞれの因子が異なるモチーフに結合することが示唆されているため、REF6/BRM と PRC2 の間でモチーフを取り合うという競合的な結合で拮抗的な遺伝子発現制御が説明できる可能性は低い。また、ゲノムワイドに見ると、PRC2 と REF6 の結合パターンは重ならない。REF6 は PRC2 が導入した H3K27me3 の境界によく見られる (Yan et al. 2018)。現時点では、分子基盤は不明だが、REF6 は H3K27me3 の拡散を防いでいる可能性が考えられる。

REF6 による二本鎖 DNA の認識は、モチーフの配列に依存するだけでなく、DNA メチル化にも影響される (Qiu et al. 2019)。REF6 は、DNA メチル化のレベルが低い CTCTGYTY モチーフに結合しやすいことがわかっている。モチーフの中に CHG のメチル化がある場合には、REF6 の結合の親和性が低下する (図 2F)。シロイヌナズナゲノム中には、CTCTGYTY モチーフが多数あるものの、実際に REF6 の結合が見られるのはそのうちの 15%ほどである。そのため、CHG のメチル化などの *in vivo* での環境が REF6 の標的への認識へ関与すると考えられる。

4. H3K27me3 のヒストン脱メチル化酵素である JMJ の変異体の表現型と主要な標的

JMJ タンパク質は、特定の発生段階や環境変化を読み取り、抑制的な H3K27me3 マークを除去する。これにより、発生や環境応答を制御すると考えられている。実際に、シロイヌナズナの *jmj* 機能喪失変異体では、発生や環境応答において異常が多く報告されている。植物の発生においては、REF6, ELF6, JMJ13 が広く機能する。一方、JMJ30 と JMJ32 は、特定の環境に適応するために働く例が多い。

REF6 は、発芽の時期を決めるのに必要であることがわかっている。*ref6* 変異体の種子では、野生型よりも発芽のタイミングが遅れる (Li et al. 2016; Chen et al. 2020)。REF6 は H3K27me3 を除去することで、ABA の生合成に関する 2 つの重要な遺伝子、*CYP707A1* と *CYP707A3* の発現を誘導する (Chen et al. 2020)。*CYP707A1* と *CYP707A2* は ABA 8'-ヒドキシラーゼをコードし、ABA レベルの低下に重要な役割を果たす (Okamoto et al. 2006)。*ref6* 変異体背景で *CYP707A1* 遺伝子を過剰発現させると、*ref6* 変異体の発芽が遅れる表現型は回復する (Chen et al. 2020)。

REF6 と ELF6 はどちらも葉の発生において重要な役割を果たす。通常の生育条件下では、*ref6* 変異体と *elf6* 変異体では葉の表現型が似ており、ブラシノステロイド (BR) 欠損変異体によく見られるような葉柄の長さの減少を示す (Yu et al. 2008)。しかしながら、葉身に注目すると、*ref6* では短くなるものの、*elf6* では見られない。このことは、REF6 と ELF6 タンパク質が組織特異的に異なる役割を持つことを示唆している。葉の発達の後期では、*ref6* においてクロロフィルの分解が遅れる (Wang et al. 2019)。REF6 は、*ETHYLENE INSENSITIVE 2* (*EIN2*)、*OLEOSIN 1* (*ORE1*)、*NONYELLOWING* 遺伝子 (*NYEs*) などの老化関連遺伝子を直接活性化することで葉の老化を促進させる役割を果たしている (Wang et al. 2019)。

JMJ13 は、発生において REF6 や ELF6 と冗長的に機能する場合と、異なる役割を持つ場合があると考えられている。*jmj13* 単一変異体では葉の形態異常は報告されていない (Zheng et al. 2019)。しかし、*ref6 elf6 jmj13* 三重変異体は *ref6 elf6* よりも葉柄が短いことから、JMJ13 は REF6 や ELF6 と冗長的に機能する部分があると考えられている (Yan et al. 2018)。花の発生過程では、JMJ13 と REF6, ELF6 との間に、機能の違いが見られている (Keyzor et al. 2021)。通常、野生型でも、最初の 1~2 つの花は自家受粉せず、種子のない非常に短い果実を形成することが多い。*ref6* 変異体の場合には、野生型とほとんど変わらない。一方で、*jmj13* 変異体では 8 番目に形成される花くらいまでは、ほとんど種子ができない。*jmj13* の花では、*JASMONATE-ZIM-DOMAIN PROTEIN 7* (*JAZ7*) , *SMALL AUXIN UP RNA 26* (*SAUR26*) , *ARABINOGALACTAN PROTEINs* (*AGPs*) など、雄しべの発達に参与する遺伝子の発現が低下するため、受粉しにくいと考えられている (Keyzor et al. 2021)。しかし、*elf6* では、最初に形成される花から受粉し、種子ができる場合が多い。このように、REF6, ELF6 , および JMJ13 は共通した機能と、独自の機能の両方を果たしていると考えられる。

JMJ30 および JMJ32 の機能は、REF6, ELF6 および JMJ13 とは異なる報告例が多い。実際に我々が観察した場合でも、*jmj30* や *jmj32* 単一変異体では、*ref6*, *elf6*, および *jmj13* で見られたような、発芽時期の異常、葉の形態異常、花の受粉の以上などは見られていない

(Yamaguchi et al. 2021)。また、*jmj30 jmj32* 二重変異体でもこれらの変異体では観察されていないことから、JMJ30 と JMJ32 は、REF6, ELF6, JMJ13 などとは別の役割を持つと考えられる。*JMJ30* 遺伝子は時計遺伝子である *TIMING OF CAB1 EXPRESSION 1* (*TOC1*) と発現が同調している遺伝子として同定された (Lu et al. 2011b)。*JMJ30* と *TOC1* は遺伝的に相互作用し、*CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1* (*CCA1*) と *LATE ELONGATED HYPOCOTYL* (*LHY*) の発現を促進する。その一方で、*JMJ32* の発現には概日振動が見られない (Lu et al. 2011b)。そのため、*JMJ30* と *JMJ32* は異なるメカニズムで制御されていることが示唆される。

jmj30 変異体および *jmj30* 変異体を含む多重変異体では、環境条件に依存した表現型を示すこともわかっている。*jmj30* 変異体では、カルスの形成能が低下する。この条件下では、JMJ30 は *LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN 16* (*LBD16*) と *LBD29* の発現を促進する (Lee et al., 2018)。さらに、ABA によって誘導される種子の成長停止は、*jmj30 jmj32* 二重変異体では見られない (Wu et al. 2019a; Wu et al. 2019b; Wu et al. 2020)。JMJ30 は *SNF1-RELATED PROTEIN KINASE 2.8* (*SnRK2.8*) と *BRASSINAZOLE RESISTANT1* (*BZR1*) を直接活性化し、ストレス応答と成長のバランスを維持している。高温の経験を記憶する能力も *jmj30 jmj32 ref6 elf6* 四重変異体では低下している (Yamaguchi et al. 2021; Yamaguchi and Ito 2021a; Yamaguchi and Ito 2021b)。JMJ30 は熱に応答して *HEAT SHOCK PROTEIN 17.6C* (*HSP17.6C*) と *HSP22* に結合する。これら遺伝子の H3K27me3 を除去し、しばらくそのヒストン修飾状態を維持することで、高温情報を記憶して適応することがわかっている。

興味深いことに、5 つのヒストン脱メチル化酵素はすべて開花時期を制御する。しかしながら、変異体の表現型やそれが見られる条件は異なっている。長日条件下では、*ref6* 変異体

は遅咲きであり、*elf6* と *jmj13* 変異体は早咲きである (Noh et al. 2004; Zheng et al. 2019) 。REF6 は、*SOC1* 遺伝子を直接誘導する (Hou et al. 2014; Hyun et al. 2016) 。ELF6 は花成抑制遺伝子である *FLOWERING LOCUS C* (*FLC*) に結合して、H3K27me3 の除去を介して転写を活性化する (Yang et al. 2016) 。*jmj13* 変異体では、花成抑制遺伝子 *SHORT VEGETATIVE PHASE* (*SVP*) の発現が低下する。一方で、*jmj30 jmj32* は高温環境下でのみ早咲きになる (Gan et al. 2014; Yan et al. 2014) 。高温により *JMJ30* の蓄積量が増加し、*FLC* 遺伝子座から H3K27me3 が除去されることがその背景にある。変異体の表現型は一致している場合もあるが、ヒストン脱メチル化酵素ごとに、異なる標的を制御している可能性が高い。

5. おわりに

植物の発生過程や環境応答における遺伝子発現は、主にエピジェネティックな調節によって頑健かつ柔軟に制御されている。トランスクリプトーム、エピゲノム、結晶構造解析を用いた植物エピジェネティクスの研究の進展により、H3K27me3 の重要性が明らかになってきた。シロイヌナズナでは、H3K27 の脱メチル化が 5 つの *JMJ* タンパク質によって調節されている。5 つの *JMJ* を包括的に比較した解析はなく、単純化した結論を提供しにくい状況である。ただ、配列の相同性以外は、標的の認識様式・変異体の表現型などはむしろ異なっているように見える。時間や空間などの解像度を高め、できるだけ *in vivo* のコンテキストを反映させた状況での解析結果を得ることで、研究は加速する可能性がある。また、得られた結果を、二次的な影響が蓄積する変異体の解析結果に囚われすぎることなく、初期の応答、あるいは直接の影響を検証することで、新しい知見が得られることを期待する。

引用文献

- Antunez-Sanchez J, Naish M, Ramirez-Prado JS, Ohno S, Huang Y, Dawson A, Opassathavrian K, Manza-Mianza D, Ariel F, Raynaud C, et al. (2020) A new role for histone demethylases in the maintenance of plant genome integrity. *e-Life* 27: e58533. <https://doi.org/10.7554/eLife.58533>
- Bezhani S, Winter C, Hershtman S, Wagner JD, Kennedy JF, Kwon CS, Pfluger J, Su Y, Wagner D. (2007) Unique, shared, and redundant roles for the Arabidopsis SWI/SNF chromatin remodeling ATPases BRHAMA and SPLAYED. *Plant Cell* 19: 403-416. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.048272>
- Bruneau BG, Koseki H, Strome S, Torres-Padilla M-E (2019) Chromatin and epigenetics in development: a Special Issue. *Development* 146. <https://doi.org/10.1242/dev.185025>
- Chen H, Tong J, Fu W, Liang Z, Ruan J, Yu Y, Xia K, Li C, Liu H, Deng X (2020) The H3K27me3 Demethylase RELATIVE OF EARLY FLOWERING6 Suppresses Seed Dormancy by Inducing Abscissic Acid Catabolism. *Plant Physiol.* 184: 1969-1978. <https://doi.org/10.1104/pp.20.01255>
- Crevillén P (2020) Histone demethylases as counterbalance to H3K27me3 silencing in plants. *iScience* 23: 101715. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101715>
- Crevillén P, Yang H, Cui X, Greeff C, Trick M, Qiu Q et al. (2014) Epigenetic reprogramming that prevents transgenerational inheritance of the vernalized state. *Nature* 515: 587-590. <https://doi.org/10.1038/nature13722>

- Cui X, Lu F, Qiu Q, Zhou B, Gu L, Zhang S, Kang Y, Cui X, Ma X, Yao Q (2016) REF6 recognizes a specific DNA sequence to demethylate H3K27me3 and regulate organ boundary formation in *Arabidopsis*. *Nat. Genet.* 48: 694-699. <https://doi.org/10.1038/ng.3556>.
- Eccleston A, Cesari F, Skipper M (2013) Transcription and epigenetics. *Nature* 502:461. <https://doi.org/10.1038/502461a>
- Gan ES, Xu Y, Wong JY, Goh JG, Sun B, Wee WY, Huang J, Ito T (2014) Jumonji demethylases moderate precocious flowering at elevated temperature via regulation of FLC in *Arabidopsis*. *Nat. Commun.* 5: 5098. <https://doi.org/10.1038/ncomms6098>.
- Hecker A, Brand LH, Peter S, Simoncello N, Kilian J, Harter K, Gaudin V, Wanke D (2015) The *Arabidopsis* GAGA-Binding Factor BASIC PENTACYSSTEINE6 Recruits the POLYCOMB-REPRESSIVE COMPLEX1 Component LIKE HETEROCHROMATIN PROTEIN1 to GAGA DNA Motifs. *Plant Physiol.* 168: 1013-1024. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00409>.
- Hou X, Zhou J, Liu C, Liu L, Shen L, Yu H (2014) Nuclear factor Y-mediated H3K27me3 demethylation of the SOC1 locus orchestrates flowering responses of *Arabidopsis*. *Nat. Commun.* 5: 4601. <https://doi.org/10.1038/ncomms5601>
- Hyun Y, Richter R, Vincent C, Martinez-Gallegos R, Porri A, and Coupland G (2016) Multi-layered regulation of SPL15 and cooperation with SOC1 integrate endogenous flowering pathways at the *Arabidopsis* shoot meristem. *Dev. Cell* 37: 1-13. <http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2016.04.001>
- Keyzor C, Mermaz B, Trigazis E, Jo S, Song J (2021) Histone demethylases ELF6 and JMJ13 antagonistically regulate self-fertility in *Arabidopsis*. *Front. Plant Sci* 12: 640135. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.640135>
- Lee K, Park O, Seo PJ (2018) JMJ30-mediated H3K9me3 demethylation drives tissue identity changes to promote callus formation in *Arabidopsis*. *Plant J.* 95: 961-975. <https://doi.org/10.1111/tpj.14002>
- Li C, Gu L, Gao L, Chen C, Wei C-Q, Qiu Q, Chien C-W, Wang S, Liu Y, Wu K, et al. (2016) Concerted genomic targeting of H3K27 demethylase REF6 and chromatin remodeling ATPase BRM in *Arabidopsis*. *Nat. Genet.* 48: 687-693. <https://doi.org/10.1038/ng.3555>.
- Li C, Chen C, Gao L, Yang S, Nguyen V, Shi X, Lai Y, Wu K (2015) The *Arabidopsis* SWI2/SNF2 chromatin remodeler BRAHMA regulates Polycomb function during vegetative development and directly activates the flowering repressor gene SVP. *PLoS Genet* 11: e1004944. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004944>.
- Lu F, Li G, Cui X, Liu C, Wang XJ, Cao X (2008) Comparative analysis of JmjC domain-containing proteins reveals the potential histone demethylases in *Arabidopsis* and rice. *J Integr Plant Biol.* 50: 886-896. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2008.00692.x>
- Lu F, Cui X, Zhang S, Jenuwein T, Cao X (2011a) *Arabidopsis* REF6 is a histone H3 lysine 27 demethylase. *Nat. Genet.* 43: 715-719. <https://doi.org/10.1038/ng.854>
- Lu SX, Knowles SM, Webb CJ, Celaya RB, Cha C, Siu JP, Tobin EM (2011b) The Jumonji C domain-containing protein JMJ30 regulates period length in the *Arabidopsis* circadian clock. *Plant Physiol.* 155: 906-915. <https://doi.org/10.1104/pp.110.167015>.

- Noh B, Lee S, Kim H, Yi G, Shin E, Lee M, Jung K, Lee I (2004) Divergent roles of a pair of homologous jumonji/zinc-finger-class transcription factor proteins in the regulation of Arabidopsis flowering time. *Plant Cell* 16: 2601-2613. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.025353>.
- Qian S, Wang Y, Ma H, Zhang L (2015) Expansion and Functional Divergence of Jumonji C-Containing Histone Demethylases: Significance of Duplications in Ancestral Angiosperms and Vertebrates. *Plant Physiol.* 168: 1321-1337. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00520>
- Qiu Q, Mei H, Deng X, He K, Wu B, Yao Q, Zhang S, Zhou B, Cui X, Cao X, et al. (2019) DNA methylation repels targeting of Arabidopsis REF6. *Nat. Commun.* 10: 2063. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10026-1>.
- Tian Z, Li X, Li M, Wu W, Zhang M, Tang C, Xue Y, Liu B, Zhu B (2020) Crystal structures of REF6 and its complex with DNA reveal diverse recognition mechanisms. *Cell Discov.* 6: 17. <https://doi.org/10.1038/s41421-020-0150-6>.
- van Steensel B, Furlong EEM (2019) The role of transcription in shaping the spatial organization of the genome. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 20: 327-337. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0114-6>.
- Vergara Z, Gutierrez C (2017) Emerging roles of chromatin in the maintenance of genome organization and function in plants. *Genome Biol.* 18: 96. <https://doi.org/10.1186/s13059-017-1236-9>
- Wang X, Gao J, Gao S, Song Y, Yang Z, Kuai B (2019) The H3K27me3 demethylase REF6 promotes leaf senescence through directly activating major senescence regulatory and functional genes in Arabidopsis. *PLoS Genet.* 15: 1-24. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008068>.
- Wu J, Ichihashi Y, Suzuki T, Shibata A, Shirasu K, Yamaguchi N, Ito T (2019) Absciscic acid-dependent histone demethylation during post-germination growth arrest in Arabidopsis. *Plant Cell Environ.* 42: 2198-2214. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008068>
- Wu J, Yamaguchi N, Ito T (2019b) Histone demethylases control root elongation in response to stress-signaling hormone absciscic acid. *Plant Signal. Behav.* 14: 1604019. <https://doi.org/10.1080/15592324.2019.1604019>
- Wu J, Yan M, Zhang D, Zhou D, Yamaguchi N, Ito T (2020) Histone demethylases coordinate the antagonistic interaction between absciscic acid and brassinosteroid signaling in Arabidopsis. *Front. Plant Sci.* 11: 596835. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.596835>
- Wu MF, Sang Y, Bezhani S, Yamaguchi N, Han SK, Li Z, Su Y, Slewinski TL, Wagner JD, Jack T, et al. (2012) SWI2/SNF2 chromatin remodeling ATPases overcome polycomb repression and control floral organ identity with the LEAFY and SEPALLATA3 transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 3576-3581. <https://doi.org/10.1073/pnas.1113409109>.
- Xiao J, Jin R, Yu X, Shen M, Wagner JD, Pai A, Song C, Zhuang M, Klasfeld S, He C, et al. (2017) Cis and trans determinants of epigenetic silencing by Polycomb repressive complex 2 in Arabidopsis. *Nat. Genet.* 49: 1546-1552. <https://doi.org/10.1038/ng.3937>.
- Xiao J, Lee US, Wagner D (2016) Tug of war: adding and removing histone lysine methylation in Arabidopsis. *Curr. Opin. Plant Biol.* 34: 41-53. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2016.08.002>

- Xiao J, Wagner D (2015) Polycomb repression in the regulation of growth and development in *Arabidopsis*. *Curr. Opin. Plant Biol.* 23: 15-24. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2014.10.003>
- Yamaguchi N, Ito T (2021a) Expression profiling of H3K27me3 demethylase genes during plant development and in response to environmental stress in *Arabidopsis*. *Plant Signal Behav.* 16: 1950445. doi: 10.1080/15592324.2021.1950445
- Yamaguchi N, Ito T (2021b) JMJ Histone Demethylases Balance H3K27me3 and H3K4me3 Levels at the *HSP21* Locus during Heat Acclimation in *Arabidopsis*. *Biomolecules.* 11: 852. doi: 10.3390/biom11060852
- Yamaguchi N, Matsubara S, Yoshimizu K, Seki M, Hamada K, Kamitani M, Kurita Y, Nomura Y, Nagashima K, Inagaki S, et al. (2021) H3K27me3 demethylases alter HSP22 and HSP17.6C expression in response to recurring heat in *Arabidopsis*. *Nat. Commun.* 12: 3480. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23766-w>.
- Yan W, Chen D, Smaczniak C, Engelhorn J, Liu H, Yang W, Steiner U, Alves-Ferreira M, Kohler C, Kaufmann K (2018) Dynamic and spatial restriction of Polycomb activity by plant histone demethylases. *Nat. Plants* 4: 681-689. <https://doi.org/10.1038/s41477-018-0219-5>.
- Yan Y, Shen L, Chen Y, Bao S, Thong Z, Yu H (2014) A MYB-domain protein EFM mediates flowering responses to environmental cues in *Arabidopsis*. *Dev. Cell* 30: 437-448. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.07.004>
- Yang H, Howard M, Dean C (2016) Physical coupling of activation and derepression activities to maintain an active transcriptional state at FLC. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113: 9369-9374. <https://doi.org/10.1073/pnas.1605733113>
- Yu X, Li L, Li L, Guo M, Chory J, Yin Y (2008) Modulation of brassinosteroid-regulated gene expression by Jumonji domain-containing proteins ELF6 and REF6 in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105: 7618-7623. <https://doi.org/10.1073/pnas.0802254105>
- Zheng S, Hu H, Ren H, Yang Z, Qiu Q, Qi W, Liu L, Wang S, Xie Q, Cui X, et al. (2019) The *Arabidopsis* H3K27me3 demethylase JUMONJI 13 is a temperature and photoperiod dependent flowering repressor. *Nat. Commun.* 10: 1303. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09310-x>.
- Zhu Y, Klasfeld S, Jeong CW, Jin R, Goto K, Yamaguchi N, Wagner D (2020) TERMINAL FLOWER1-FD complex target genes and competition with FLOWERING LOCUS T. *Nat. Commun.* 11: 5118. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18782-1>
- Zhou Y, Wang Y, Krause K, Yang T, Dongus JA, Zhang Y, Lee JY, Liu B, Zhang Y, Dong J, et al. (2018). Telobox motifs recruit CLF/SWN-PRC2 for H3K27me3 deposition via TRB factors in *Arabidopsis*. *Nat. Genet.* 50: 638. <https://doi.org/10.1038/s41588-018-0109-9>.