

Journal of Ecology (2010) Vol. 98, pp. 374-383

Variation in gene expression of *Andropogon gerardii* in response to altered environmental conditions associated with climate change

SE Travers, Z Tang, D Caragea, KA Garrett, SH Hulbert, JE Leach, J Bai,
A Saleh, AK Knapp, PA Fay, J Nippert, PS Schnable and MD Smith

Summary

1. 気候変動に対する生物の反応のメカニズムを理解するためには、自然条件において非モデル生物に焦点を当てた研究が必要である。気候変動に焦点を当てた生物の反応をシミュレートするために、温度と降水量を操作した野外実験区において *Andropogon gerardii* (北米の草原に自生するイネ科植物) の転写プロファイルを評価した。
2. 近縁種であるトウモロコシ *Zea mays* で開発されたマイクロアレイを用いて、7,000 以上の遺伝子の発現レベルに対する温度と土壤水分量の相対的な影響の比較、反応性の高い遺伝子の機能群の特定、生理学的な反応と遺伝子の転写の相関の特定を行った。
3. その結果、水ストレスよりも温度ストレスに対する遺伝子の転写レベルでの統計的に有意なシフトが確認された。また、特にクロロフィル蛍光の変異に対して顕著であったが、生理学的な変異と密接に関連した転写レベルの候補遺伝子を特定した。
4. これらの結果は、生態的に重要な種が、今後予想される気候変動がもたらす環境変異に対して様々に反応することを示唆している。これらの転写の変化は、表現型の特性、最終的には適応的な反応に影響する可能性を持っている。

Introduction

生物の環境への応答に関してゲノムレベルでの解明が必要

- 生物の個体や集団は変化する環境にどのように応答するのか？
 - 種の生態や進化を考える上での重要なステップ
 - 気候変動に対して生物の応答を予測する上でも重要な課題
- 生物的・非生物的環境の変異は遺伝子発現から形質まで様々なスケールで影響するが、遺伝子発現は環境変化やストレスに対して形態や生理よりも急速に反応
- モデル生物では膨大なゲノム情報を利用した遺伝子の転写パターンの評価が可能
- 遺伝子や生化学レベルでの植物の機能的応答の評価によって答えられる疑問
 - 植物が環境やストレスの変異に対してどのように立ち向かうのか？
 - 個体の成長や生残の遺伝的基盤がどうやって決まっているのか？
- 環境変化に対する個体の反応の変異は適応度や自然選択の変異に影響する
- ストレスの生理学と攪乱の生態学に関しては膨大な研究が積み重ねられている
 - ⇨植物が環境の変化に対してゲノムレベルでどのように適応するのか？
 - ⇨野外条件下で野生植物がゲノムレベルでどのように反応するのか？

これらの問いについてはまだまだ理解が不十分
実験室から野外へ、モデル生物から非モデル生物へ

- ゲノム技術の進歩により、環境条件と遺伝子の転写パターンが明らかにされてきた
⇨しかし、その多くが完全にコントロールされた理想的な条件
- コントロールされた条件と野外条件では遺伝子発現パターンは相当異なる
- モデル生物の発現パターンを非モデル生物の発現パターンに適用できるのか?
→自然環境条件下での非モデル生物を用いた遺伝子発現パターンの研究が必要

研究対象植物と先行研究

- *Andropogon gerardii* (イネ科) ちなみにメリケンカルカヤは *Andropogon* 属
北米に広域分布する C4 植物でプレーリーの優占種
- 土壌水分量 (降雨量) を操作して遺伝子発現を調べた先行研究 (Travers et al. 2007)
降雨を一部遮断して土壌水分量を制限し、近縁種のマイクロアレイを用いて発現解析
降雨量の変化により、炭素固定・光化学系・ストレス関連の発現量が変化
乾燥ストレスによる生産性の減少と遺伝的な関連を野外条件ではじめて明示
ただし、生産性が高い季節終盤 (9 月) のデータで降水量 (水分量) のみに着目
- 植物のストレスは春から夏にかけて変化 (Nippert et al. 2009)
- 成長期間を通してストレスの変化と生理的・遺伝子発現的な変化の評価が必要
- さらには降水量以外の環境変化 (ex. 温度) と遺伝子発現の関連は?

目的: 降水量と温度の変化に対する *A. gerardii* の遺伝子の転写プロファイルの評価

1. 野外条件において温度・降水量の変動に対する *A. gerardii* の転写プロファイルの定量化
2. 環境変動に相関する遺伝子の機能群の特定
3. *A. gerardii* の転写プロファイルに対する環境要因の時間的変動の影響評価
4. *A. gerardii* の遺伝子発現量と生理学的反応の関係の定量化

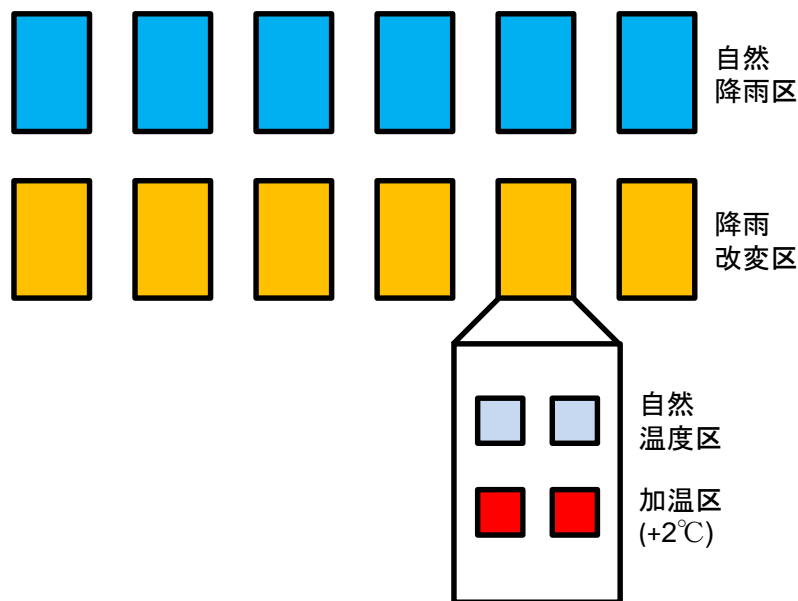
Materials and methods

降水量操作実験

- Konza Prairie 生物学ステーションにある長期気候変動フィールド試験地の降雨操作プロット (RaMPs) で調査
- USA カンザス州の北東部に位置
- グレートプレーンズ (大平原地帯)
- イネ科植物が優占する 3,487 ha のプレーリーが様々な管理形態で維持
- 大陸中央気候に属し、冬は寒くて乾燥、夏は暖かくて湿潤
- 年間降水量は 835 mm、気温は 5 月 18°C、7 月 27°C、9 月 22°C
- *A. gerardii* や *Sorghastrum nutans* が優占、その他イネ科や広葉草本、木本類が混在
- RaMPs (1998 年~) : 高茎草本群落の構造と機能に対する気候変動の影響を評価
- 12 個の降雨遮断シェルター (14×9 m) を設置し、降雨イベントを完全にコントロール

6つは自然状態の降雨と同じ…降雨が屋根に集められてすぐにシェルター内に落とす
6つは降雨イベントを改変…降雨量は自然状態と同じで降雨イベントの間隔が長い
→降雨改変区: ①長い乾燥期、②降雨イベントの減少、③一回の降雨量の増加

- シェルター内には4つの2×2mのサブプロットを設置 (totalで48プロット)
2つは自然状態で2つは気温よりも2°C上昇するように加温
- キャンピアー (群落冠) の気温、土壌深度ごとに水分量と地温を測定 (Table 1)



実験区のイメージ (横川作成)

サンプリング

- サンプリング日あたり24の植物体を採取し、12のマイクロアレイを使用
- 2005年の成長期間中に4回サンプリング (6/1 June、7/17 JulyA、7/21 JulyB、8/15 August)
- 7/17の直後に降雨があったため、7/21 (July B) は乾燥ストレスから解放されたサンプル
- 採集後、液体窒素で新鮮凍結させ遺伝解析まで保存
- 同時に、飽和最大光合成量、葉の呼吸量、クロロフィル蛍光、水分気孔コンダクタンス、瞬間水利用効率、蒸散量、葉の水ポテンシャルなどを測定 (Table 2)

マイクロアレイ解析

- RNAを抽出し、cDNA (RNAから逆転写酵素を用いて合成したDNA) を合成
→発現している遺伝子のみをスクリーニング
- 蛍光プライマーでcDNAをラベリングし、マイクロアレイにハイブリダイズ
- トウモロコシで開発されたマイクロアレイを使用 (GEO platform GPL3333; Appendix S1)
- ハイブリダイズしたアレイを二つの波長で撮影し、解析
- トウモロコシと対象種で配列が異なるためうまくハイブリダイズしない遺伝子をス

クリーニングして除外した後、標準化を行った

統計解析

- 測定した 8 つの環境条件は強く相関する組み合わせが多かった
→主成分分析で 2 軸に要約: PC1 は温度、PC2 は土壌水分量 (Fig 1)
- 処理区ごとに区分した解析ではなく、環境条件を連続的変数とした回帰分析 (Fig 1)
- 環境条件や生理的変異に対して遺伝子発現が増加 (正の傾き)、減少 (負の傾き)、期無仮説は変化なし (傾きがゼロ) として回帰分析
- アレイの蛍光強さは、アレイの位置と用いた蛍光を固定効果として回帰により標準化
- 転写のレベル、環境条件、生理的反応のデータを 6 種の線形回帰モデルで解析 (Table 3)
Model 1: (遺伝子発現) ~ (環境要因)
Model 2: (遺伝子発現) ~ (環境要因) + 【サンプリング日考慮】
Model 3: (生理学的反応) ~ (環境要因) + (遺伝子発現)
Model 4: (生理学的反応) ~ (環境要因) + (遺伝子発現) + 【サンプリング日考慮】
Model 5: (生理学的反応) ~ (遺伝子発現)
Model 6: (生理学的反応) ~ (遺伝子発現) + 【サンプリング日考慮】
- トウモロコシ遺伝子目録データベース (ZmGI) から得た遺伝子 ~~ZmGI Gene Index~~ (遺伝子の機能群) ごとのアノテーションに基づき 7,243 の遺伝子にアノテーションできた
- 解析ソフトを用いて、遺伝子オントロジー別に個々の遺伝子発現量を解析し、偶然よりも過剰/過小発現している遺伝子の有意性を検定した

Results

環境条件 (Table 4; Fig1)

- June で最も土壌水分量が高く、夏にかけて乾燥。深部よりも浅い部で乾燥 (Table 4)
- 降雨直後の July B では浅部で湿っていたが、深部ではあまり変化なし
- 地温と葉面温度は July に高く、June に低い
- 主成分分析では、PC1 (温度) と PC2 (水分) でデータのばらつきの 84% を説明
- 4 回のサンプリング日の重心が重ならない→温度と水分の組み合わせがばらばら (Fig 1)

遺伝子発現と環境条件の関係 (Fig. 2; Fig. 3)

- 得られた 19,200 の遺伝子のうち、データの質的に問題のない 7,089 (37%) を解析
- 7,098 の遺伝子のうち 1,370 (19%) が温度軸 PC1 と有意に相関があった (model1; Fig 2a)
水分軸 PC2 と相関があった発現遺伝子は 101 (1%) と少なかった (Fig 2b)
- 温度軸と相関があった 4 つの遺伝子オントロジーのカテゴリー
転写プロセス: 195 遺伝子 (負の相関)
生合成プロセス: 114 遺伝子 (負の相関)

- DNA のバインディング (結合) : 89 遺伝子 (正の相関)
- タンパク質のフォールディング (折り畳み) : 73 遺伝子 (正の相関)
- 水分軸と相関があった 4 つの遺伝子オントロジーのカテゴリー
 - 転写プロセス : 2 遺伝子 (負の相関)
 - 生合成プロセス : 51 遺伝子 (負の相関)
- DNA のバインディング (結合) : 1 遺伝子 (正の相関)
- タンパク質のフォールディング (折り畳み) : 0 遺伝子
- 基本的には温度軸と相関した発現遺伝子が多かったが、July B では水分と関連した遺伝子が多かった (Fig. 2)

- 温度軸に反応した遺伝子機能群はサンプリング日によってかなり異なっていた (Fig. 3)
- July A において、典型的なストレス反応に関するものが過剰に発現していた
熱ストレス反応、酸化ストレス反応、タンパク質のフォールディング etc...
- 分子機能に関わる遺伝子は、July A で特異的に過剰に発現していた
トランスフェラーゼ活性、プロテインキナーゼ活性などの調節
- August では、翻訳に関連する遺伝子が過剰発現するなど、他の時期と異なっていた
- 水分軸と関連した遺伝子は少なかった (July B を除いて)

生理学的な変異と遺伝子発現の関係

- 回帰分析によって、生理学的変異と遺伝子発現の関連が示された
- Model 5 (生理学的変異~遺伝子) では 7,098 の遺伝子が生理学的変異と相関 (Table 5)
- C/N 比と相関した遺伝子が最も多い (7,098 のうち 3,802) が、環境変異を考慮したモデルでは (Model 3)、C/N 比と相関した遺伝子は 1,625 に減少
葉の炭素量よりも窒素量の方が遺伝子発現との関係が密接
- クロロフィル蛍光 (F_v/F_m ; 光合成の最大収率) も多くの遺伝子発現を相関があった
クロロフィル蛍光と関連した既知遺伝子の 21% は DNA の結合などヒストンに関連
- サンプリング日レベルの解析では遺伝子発現と関連した生理学的変異は少ない (Table 6)
June にいたっては 0 遺伝子、水不足の July A では 2 遺伝子
- クロロフィル蛍光は、August で 30 の遺伝子発現レベルと相関 (環境変異の考慮無)
- 環境変異を考慮した August のデータ
 - 飽和光合成量、気孔コンダクタンス、蒸散量は遺伝子 BM079333 (水分輸送に関連した細胞膜タンパクに関わる遺伝子) の発現レベルと相関
 - クロロフィル蛍光は CB411262 (メチル化 CpG 結合タンパク) と DV549941 (機能不明) と相関

Discussion

- 本研究では、野外条件下で生態的に重要な非モデル生物に関して、環境要因と生理学

的変異に対する遺伝子発現パターンの評価をはじめて試みた

- *A. gerardii* の転写プロファイルは環境の変異（温度と水分）に変化し、それらの関係はランダムではなかった
→変化する環境に対し、どのように成長・生残していくのか？という疑問へのヒント

環境要因と遺伝子発現

- July A（最もストレスフル）には多くの遺伝子発現が環境軸と相関（Fig. 2）
さらには July A において、多くのストレスに関連した遺伝子が過剰に発現（Fig. 3）
⇔対照的に、調査はじめの June には多くの遺伝子が過小発現
→ストレスフルなコンディション（高温・乾燥）が様々な遺伝子を過剰発現させる
- 作物における多くの研究で熱・乾燥ストレスで過剰発現した遺伝子
タンパク質三次構造の維持（ヒートショックプロテイン：熱からの細胞の保護）
抗酸化反応（スーパーオキシドジスムターゼ：酸化ストレスの軽減）
- 地温は中間的で水分量は高い June と July B では過剰発現した遺伝子は少ない（Fig 3）
- 多くの遺伝子は土壌水分ではなく、温度と相関が強かった
⇔July B の降雨直後は例外で、多くの遺伝子が水分軸と正の相関（Fig. 2）
リボソームの機能や翻訳に関連した遺伝子とヒストンに関連した遺伝子が顕著
- *A. gerardii* の転写プロファイルは成長期を通して変化
→この種が環境の変化にどのように順応するのか示唆を与える
- 最もストレスフルな July A において最も多くの機能カテゴリーの遺伝子が過剰発現
→ストレス耐性に関係した生化学・生理学的反応に影響する
→一方で、他の植物の転写プロファイルと異なるかもしれない
- 本研究は、1つの環境ストレスに対する転写反応を考えるのでは不十分なことを示唆
→フィールドでは様々なストレスが存在し、その相互作用もありうる

生理学的反応と遺伝子発現

- 遺伝子発現データは、生理学的反応の推定を向上させるか？
- 環境変異を考慮した場合、今回測定した生理学的変異と相関して発現パターンを変えた遺伝子は少なかった
- クロロフィル蛍光は例外的に多くの遺伝子発現と相関していた（特に August）
- *A. gerardii* における先行研究では、植物体の生産性の減少と光合成活性は温度や水分などの環境要因と関連（Knapp et al. 2002; Nippert et al. 2009）
- 今回のクロロフィル蛍光と転写プロファイルの関係は、野外環境ストレスというコンテキストにおいて光合成効率に対するはじめての示唆である

- ストレス反応（特に水ストレス）に関する植物の特性は量的遺伝変異がある
- 今回の結果は、機能遺伝子カテゴリーから候補遺伝子の抽出を可能にする（Fig. 3）
→環境のシフトに対して特異的な反応を見つけて、直接的な実験が可能になる
- 今回測定した変異の大きさは、遺伝子発現をシフトさせるのに十分な大きさ
ex. ヒートショックプロテインや抗酸化物質生成に関与する遺伝子（Bohnert et al 1995）
- ゲノミックレベルでのシフトがどのように個体の成長・繁殖・生残に影響するか？
→候補遺伝子に対する自然選択や気候変動に対する *A. gerardii* の長期的な個体群動態に影響するだろう