

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：82105

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18723

研究課題名(和文) アスナロ属 2 変種の太平洋側・日本海側地域への適応分化をもたらした機能遺伝子の探索

研究課題名(英文) Searching for functional genes that caused adaptive differentiation of two varieties of the genus *Thujopsis* between the Pacific Ocean side and the Japan Sea side areas

研究代表者

稲永 路子 (Inanaga, Michiko)

国立研究開発法人森林研究・整備機構・森林総合研究所林木育種センター・研究員

研究者番号：30757951

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000 円

研究成果の概要(和文)：アスナロ属は日本の固有属で、太平洋側を中心に分布するアスナロと、主に日本海側に分布するヒノキアスナロの2変種で構成される。両種は気候に対する局所適応のため遺伝的に分化している可能性があることから、トランスクリプトーム解析により、変種間で分化している遺伝子の探索を試みた。1月上旬に採取した葉試料を解析したところ、ヒノキアスナロでは耐病・耐ストレス関連遺伝子の特異的な発現が見られた。一方アスナロでは花成や開花調節に関連する遺伝子の発現量が高かった。このことから、アスナロ属は変種間で気候に対する応答性が異なる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Genus *Thujopsis* is one of the conifer groups endemic in Japan, and the genus consists of two varieties, namely *Thujopsis dolabrata* var. *dolabrata*, which distributes mainly along the Pacific Ocean side of the Japanese archipelago, and var. *hondai*, mainly along the Japan Sea side. As they have quite different distribution ranges, these varieties may be genetically differentiated due to local adaptation. The purpose of this study is searching for genes differentiated between the varieties by transcriptome analysis. The gene expression analysis of leaf samples collected in early January found higher expression of the genes related to disease and stress resistance in var. *hondai*, while higher expressions of the genes related to flower regulation and flowering were found in var. *dolabrata*. Based on these results, the two varieties of *T. dolabrata* may have different response mechanisms to the environmental condition.

研究分野：森林遺伝学

キーワード：アスナロ属 局所適応 トランスクリプトーム解析 RNA-seq 低温順化 クロロフィル蛍光

## 1. 研究開始当初の背景

ある地域に分布する生物集団が生育環境に適応し、他の環境下で生育する集団より有利になる現象を局所適応という (Sork et al. 1993; Hereford 2010)。植物は発芽後に移動できないため、異なる環境下ではそれぞれの環境に適した異なる遺伝子型の個体が生き残る可能性が高まる。そのため、多様な環境に広く分布する種の遺伝変異を集団間で比較し、各地で獲得されてきた局所適応に関連する変異を検出することで、植物の生態と適応的な遺伝変異の関係を明らかにできる (Neale & Ingvarsson 2008; Tsumura et al. 2012)。特に、遺伝子の発現量 (RNA の転写量) を観測すると、直接たんぱく質を定量することなく、その生成量を推定し、植物の生理的な応答と遺伝変異を結びつけることができる (Gachon et al. 2004; Vogel & Marcotte 2012)。

広義ヒノキ科アスナロ属は日本の固有属で、アスナロとヒノキアスナロ (別名ヒバ) の2変種で構成される。アスナロは山形及び宮城県以南を中心に、冬季に乾燥する太平洋側に広く分布する。一方ヒノキアスナロは能登半島、佐渡島及び群馬県以北に分布し、日本海側の多雪地帯が分布の中心である (倉田 1964)。両変種は球果や葉の形態がわずかに異なるが、形態観察のみで変種を同定することは難しい。しかし、両変種をあわせて抽出成分及び遺伝マーカーによって行われた系統地理的研究では顕著な構造の存在が示されたことから (Takahashi et al. 2001, 2003; 佐藤ら 2015)、両変種は気候条件に対する局所適応によって遺伝的に分化している可能性がある。

## 2. 研究の目的

本研究では、RNA-seq によってアスナロ及びヒノキアスナロの遺伝子発現パターンと塩基配列を比較し、変種間で分化している機能遺伝子の候補を探索する。そして変種間の分化の程度と、変異の存在が判明した遺伝子の機能を推定することで、両変種が異なる気候に適応してきた遺伝的なメカニズムについて考察する。

## 3. 研究の方法

本研究の材料は青森県大畑ヒバ産地別見本林に植栽されたアスナロ属個体である (図 1)。そのうち、佐藤ら (2015) に基づいて各変種から 4 産地を選択し、計 8 産地から各 1 個体を発現解析に使用した (表 1、図 2)。

当初は、代表的な局所適応関連遺伝子である開花調節遺伝子をターゲットとし、春季の開花タイミングの産地間差と遺伝子発現の関係から、緯度と気候の地理的勾配への適応を観察することを計画していた。しかしその

後、文献精査と研究内容の見直しによって、低温順化過程がアスナロ属 2 変種間で異なる可能性が高いと考え、局所適応の重要な形質として観察に最適と判断したため、研究対象の採取時期を冬季に変更した。



図 1 ヒバ産地別見本林とヒノキアスナロ針葉

表 1 各産地由来個体の変種推定結果

1	北海道松山郡厚沢部村	ヒノキアスナロ
2	青森県大畑地方	ヒノキアスナロ
3	新潟県佐渡郡高千村	アスナロ
4	石川県鳳至郡河原田村	ヒノキアスナロ
5	長野県木曾地方	アスナロ
6	岐阜県中津地方	アスナロ
7	徳島県海部郡穴喰町	アスナロ
8	鹿児島県肝属郡吾平町	アスナロ

産地名は見本林設定当時の市町村名を用いた。



図 2 供試個体の産地  
● ヒバ見本林

(1) 大畑ヒバ産地別見本林に植栽された全国に由来するアスナロ属計 161 個体の針葉を採取し、DNA を抽出した。佐藤ら (2015) と同様の EST-SSR マーカー 19 座によって遺伝子型を決定し、Structure 解析 (Pritchard et al. 2000) によって各産地由来個体の変種を推定した。

(2) ヒノキアスナロ (石川県産クサアテ) 1 個体の針葉組織を 2016 年 9 月、10 月、11 月上旬及び下旬、12 月、2017 年 2 月の計 6 回採取した。各サンプルに対し低温順化の指標としてクロロフィル蛍光測定を行い、0 から -30 までの各温度で Fv/Fm 値の変動を観察した。

各採取日 (11 月上旬を除いた 5 回) のサンプルから RNA を抽出して RNA-seq を行ない、全発現データを統合して De Novo アセンブルに使用した。得られたコンティグ配列はアミノ酸配列に変換し、tBlastx による Swiss-Prot タンパク質データベースとの照合を行なった。推定されたタンパク質データを元にアノテーションを行なった後、発現解

析のためのリファレンスとした。サンプルごとの発現データをリファレンスにマッピングすることで各採取日の発現量を評価するとともに、採取日間の変動係数が最も高いコンティグ配列を抽出することでヒートマップを作成した。

(3) 全国8産地に由来するアスナロ属8個体の針葉を2016年1月4日に採取し、RNA-seqに使用した。得られたショートリードデータを(2)で作成したコンティグ配列にマッピングし、アスナロとヒノキアスナロの2変種間で発現パターンが異なるコンティグを抽出してヒートマップを作成した。

#### 4. 研究成果

(1) Structure 解析では K=2 が最適と推定され、ヒバ産地別見本林のアスナロ属個体は佐藤ら (2015) とほぼ矛盾のないクラスター (CL) に分類された。この結果から、各個体の属する変種を推定することができた (表1・図2)。例外として、発現解析に使用する新潟県産個体のみが佐藤ら (2015) と異なりアスナロに分類されたが、この個体内のクラスター比率はアスナロ CL77%、ヒノキアスナロ CL23%であった。一方、ヒバ産地別見本林に植栽されている他の新潟産個体 (5個体) ではヒノキアスナロ CL が 60 から 80% を占めることから、新潟県産集団内には遺伝構成の多くをアスナロ CL に由来する個体が含まれていることが示唆された。

(2) 9月から翌年2月にかけてのクロロフィル蛍光測定の結果、採取日によって凍結試験時の Fv/Fm の低下開始温度と低下幅が変動した (図3)。9月から11月中旬にかけて耐凍性が上昇すると凍結ダメージに伴う Fv/Fm の低下幅が減少し、最終的には温度を -30 まで低下させても 0 付近での Fv/Fm 値のまま横ばいとなる傾向が観察された。

RNA-seq の結果では、発現量の変動が大きな遺伝子群を検出することができた。11月から12月をピークに秋季から冬季にかけて発現していた遺伝子群には、光防御関連遺伝子、糖代謝関連遺伝子、デハイドリン様遺伝子などが含まれた。一方、9月に高い発現量を示し、冬季に低下する遺伝子群には貯蔵タンパ

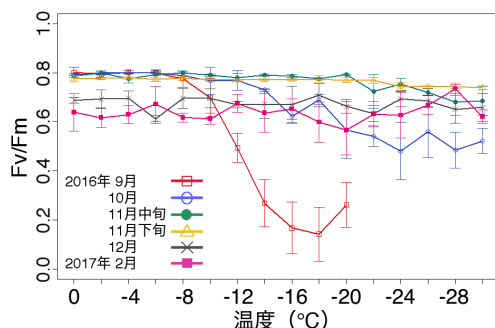


図3 石川県産ヒノキアスナロの凍結実験における季節に伴う Fv/Fm 値の変動

ク質関連遺伝子、推定 RuBisCO などが検出された。これらの結果は他樹種における先行研究と類似しており (Takata et al. 2007; Holliday et al. 2008) 妥当な結果を得られた。

(3) アスナロ属8個体の RNA-seq データをマッピングしたところ、アスナロでは花成や開花調節の関連遺伝子が多く発現し、ヒノキアスナロでは耐病性関連遺伝子が特異的に発現していた (図4)。一方、糖輸送や低温・乾燥ストレス応答に関連する遺伝子は、複数種類の遺伝子が両変種に発現していた。これらの結果より、厳冬季に発現している遺伝子の中に変種間で異なる発現パターンを示す遺伝子が存在することが示唆された。

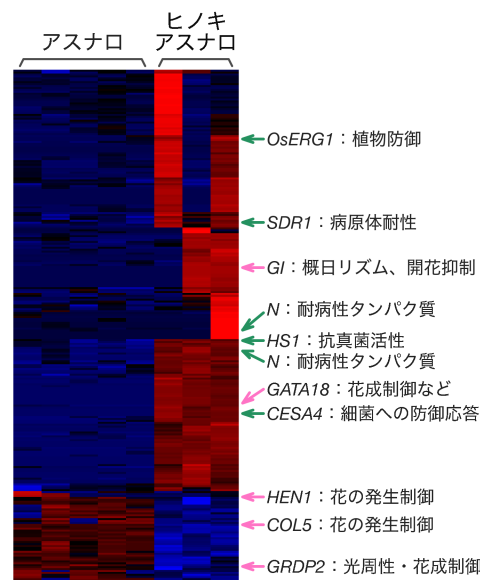


図4 厳冬季の2変種間で発現パターンが異なる遺伝子を抽出したヒートマップと他の生物種のアミノ酸配列から推定された遺伝子の例、赤は高発現、青は低発現を示す

本研究では当初の目的のうち、塩基配列の個体間比較を行うことができなかった。これは、発現量に顕著な変種間差が見られる遺伝子では、発現量が特に少ない個体で遺伝子全長のマッピングがされないために、正確な塩基配列を得ることができないといった理由による。

本研究の結果では、局所適応と遺伝子の関連までは推定できなかったものの、アスナロ属の2変種間で冬季の気候に対する応答性が異なる可能性が示唆された。また、研究成果(2)(3)で得られた各種遺伝子の情報は、他の生物種のデータベースを元に相同な遺伝子を塩基配列から推定したものであり、アスナロ属では新規の知見である。これらの情報を生かした今後の研究の方向性として、発現タイミングが特徴的な遺伝子の塩基配列を元に、異なるサンプルを使用したリアルタイム PCR による遺伝子発現の定量実験を行うことなどが考えられる。

主要参考文献：

佐藤ら (2015) 第 126 回日本森林学会大会  
PIB063, Holliday et al. (2008) *New Phytologist*  
178: 103–122, Takahashi et al. (2001)  
*Biochemical Systematics & Ecology* 29:  
839–848, Takahashi et al. (2003) *Biochemical*  
*Systematics & Ecology* 31: 723–738, Takata et al.  
(2007) *Journal of Experimental Botany* 58(13):  
3731–3742

5 . 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 2 件)

稲永路子、高田克彦、アスナロ属の低温  
順化過程における遺伝子発現パターンの  
産地間比較、第 129 回日本森林学会大会、  
2018 年

稲永路子、高田克彦、石川県産ヒバ(ク  
サアテ)1 個体の低温順化過程における遺  
伝子発現解析、森林遺伝育種学会 6 回大  
会、2017 年

6 . 研究組織

(1)研究代表者

稲永 路子 (INANAGA, Michiko)  
国立研究開発法人森林研究・整備機構・森  
林総合研究所・林木育種センター・研究員  
研究者番号：30757951