

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 5 月 20 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07838

研究課題名(和文) 遺伝的効果とエピジェネティック効果の評価によるブナ機能形質の多様性予測方法の開発

研究課題名(英文) Development of a method for predicting diversity of functional traits of beech based on the evaluation of genetic and epigenetic effects

研究代表者

鳥丸 猛 (Torimaru, Takeshi)

三重大学・生物資源学研究所・准教授

研究者番号：10546427

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：東日本を中心に日本の広域に分布する森林植生の主要構成樹種であるブナのゲノム配列情報を取得し、塩基配列長が約530Mbpであることを解明した。ブナ天然林に設置された固定調査区に生育するブナ林の遺伝的変異を調査した結果、ゲノム全体にわたり探索された一塩基多型の遺伝子型の空間分布は花粉・種子散布などの生態学的過程を反映していた。一方、乾燥応答の候補遺伝子の一塩基多型の遺伝子型の空間分布は森林内の微小環境に影響を受けている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

森林植生は自然災害を低減させる公益的機能を有しているが、一方、現代はこれまでにない急激な気候変動に曝されており、森林植生の衰退が懸念される。そのため、樹木自身に秘められた「環境に柔軟に適応していくことのできるゲノム情報」を収集することは、森林植生のもつ将来の存続可能性を評価する上で必要不可欠である。そのため本研究は、森林の保全技術に科学的根拠を提示できるという学術的意義があり、同時に森林保全を通じた安全な人間社会の構築に資する社会的意義も併せ持つものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We obtained genome sequence information of beech, which is a main constituent tree species of forest vegetation distributed widely in Japan mainly in eastern Japan, and clarified that the sequence length is about 530 Mbp. As a result of examining genetic variation of beech forest which grows in a monitoring plot established in a natural beech forest, the spatial distribution of the genotype of genome-wide single nucleotide polymorphism reflected ecological process such as pollen and seed dispersal. On the other hand, it was suggested that the spatial distribution of genotypes of single nucleotide polymorphisms in candidate genes for drought response might be affected by the microenvironment in the forest.

研究分野：森林生態遺伝学

キーワード：ブナ林 ドラフトゲノム 乾燥応答 MYB遺伝子 一塩基多型

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、我が国では急激な気候変化による土砂流出・河川氾濫によって多くの人命が失われており、それらの自然災害を低減する効果をもつ森林植生を保全する社会的要請がより一層高まっている。したがって、森林植生の保全指針の判断材料となる生物学的データを得るため、将来の健全性や存続可能性を的確に定量化する技術の開発が課題となっている。近年の研究から、生態系機能は種多様性の増加とともに単純増加するのではなく、やがて頭打ちになることが分かってきたため、生物群集の健全性と将来の存続可能性を的確に定量化するためには、種多様性よりも生態系機能に直接関与する「生物自身もつ生存に必要不可欠な形質（以後、機能形質）」の多様性を評価する必要があると認識されつつある。特に、樹木は環境変化に対して形態（葉面積など）や生理的機能（水分保持能力など）を変化させる表現形質の可塑性を発達させており、異なる樹種間のみならず同樹種の個体間でも機能形質は変異に富んでいる。したがって、森林の生態系機能を的確に評価するためには、異なる樹種間ばかりでなく、同樹種内における機能形質の変異の定量化とそれを創出する要因を解明する必要がある。

従前の研究から、樹木の種内における機能形質の変異は、自然集団において異なる土壌水分・光環境下に生育する個体間、圃場などの人工的に均一化された環境で異なる母樹由来の個体間に認められており、実際の自然集団内の環境下でも個体間の遺伝的変異が機能形質の変異を創出する可能性が示唆される。一方、同じ母樹の実生間にも異なる環境によって形質が変異することが報告されており、母家系内の実生間の遺伝的な類似性は極めて高いことを考慮すると、異なる環境下に生育する実生間で遺伝的（DNA塩基配列の）差異をともしない変異が創出された可能性がある。この変異はエピジェネティック変異と呼ばれ、機能形質をコードするDNA塩基配列上におけるメチル基などの化学的修飾の付加パターンが外部環境からの刺激を受けて変化するため、実際の遺伝子発現パターンが異なり、表現形質も異なるものである。このように、環境変化に対する樹木の成長・生残に関わる形質の変化を的確に評価するためには、自然集団におけるゲノムの変異（遺伝的変異とエピジェネティック変異）の実態の解明が必要である。

### 2. 研究の目的

申請者は、実際の局所スケールにおける自然集団内の異なる環境下に複数の母樹から収集したブナの当年生実生を移植・生育させた結果、同じ環境下でも葉面積などの光合成能力に関わる機能形質に母家系間の変異が生じることや同じ母樹由来の実生でも光環境により根長などの水分獲得能力に関わる機能形質に変異が生じることを明らかにしてきた。そのため本研究は、ブナのゲノム変異の解明に必要不可欠であるゲノムの一次情報（塩基配列）を解明し、実際のブナ天然林における環境適応に関わるゲノムの変異の実態解明を試みることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) ブナのドラフトゲノムの構築

三重大学構内の圃場に生育する20年生程度のブナから新葉を採取し、長鎖ゲノムを抽出した。ゲノムを10X Genomic Chromiumプラットフォームで処理した後、Novaseq6000シーケンサーによって150pbペアエンドのショートリードを取得した。そして、アセンブラーSupernova2.0.0でスキャホールド配列を構築するとともにフェージングを行った。また、別途、同個体の長鎖ゲノムをOxford Nanoporeシーケンサーで読み、150pbペアエンドのショートリードとともにアセンブラーMasurcaによるハイブリッドアセンブリを実行した。さらにMasurcaで得られたスキャホールド配列をHaploMerger2によってフェージングした。これらの得られた配列の性能をBUSCO解析(gVolanteによるweb上での解析)によって評価した。

#### (2) ブナ天然林における非中立性を示す塩基多型の探索

白山国立公園内刈込池周辺に分布するブナ天然林に設置された1ha(100m×100m)において胸高直径5cm以上のブナ成木から葉を採取してDNAを抽出し、マイクロサテライトマーカー7遺伝子座を用いて中立な遺伝的変異を定量化した。さらに、illuminaシーケンサーをベースに開発されたゲノムワイドな塩基多型(以後、SNP)検出法であるMig-seq法をIon Protonシーケンサーで適用するために、バーコード配列およびプライマー配列を改変した。そして、前述のブナ集団にMig-seq法を適用し、SNP検出ソフトウェアStacks2.0を用いて得られたリードを(1)のアセンブラーSupernova2.0.0によって構築されたドラフトゲノムにマッピングし、中立なSNP変異を定量化した。また、ブナにおいて見出された乾燥応答の候補遺伝子であるFcMYB1603の第二エキソンと第三エキソンの一部の塩基配列を読み、その領域内のSNPの検出を試みた。次に、ブナ成木の根元位置情報から算出されるMoran Eigenvector Map(MEM)とSNP遺伝子型の相関関係をMoran Spectral Outlier Detection(以下、MSOD)法によって検証した。また、固定調査区を5m×5mのメッシュに区切り、メッシュ内の環境状態(ササとシダの被覆度、表層土壌の礫/岩の割合)を調査するとともに、固定調査区内の標高データから各メッシュの地形に起因する土壌水分状態を表すTopographic Wetness Index(以下、TWI)を算出した。ササとシダの被覆度、表層土壌の礫/岩の割合、ならびにTWIの数値を非計量多次元尺度法(以下、NMDS法)によって次元縮約した。そして、ブナ成木の各個体の根元位置におけるそれらの変数を内挿あるいは外挿して推定し、SNP遺伝子型との相関関係をMoran Spectral

Randomization (MSR) 法によって検定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) ブナのドラフトゲノムの構築

50kbp 以上の長鎖 DNA を抽出し、10× Chromium を用いた Phased ゲノムライブラリーの作成と Novaseq6000 を用いた 150bp ペアエンドによるシーケンシングを外部委託した結果、総塩基数 344,821,524,300bp、リード数 2,298,810,162 リードであった。さらに Supernova2.0.0 によるアセンブリの結果、アセンブリサイズは 341,996,530bp、カバレッジは×44、スキマホールド数は 50,098、キャホールド N50 は 369,236bp (約 369Kbp)、推定ゲノムサイズは 529,593,000bp (約 530Mbp)、BUSCO 解析におけるコア遺伝子セットの 93.7% (Single:86.9%, Double:6.8%) を網羅していることが明らかになった。Oxford Nanopore 社のロングリードと Novaseq6000 を用いた 150bp ペアエンドによるショートリードのシーケンシングおよび Masruca によるアセンブリの結果、アセンブリサイズは 664,186,061 bp、スキマホールド数は 3636、スキマホールド N50 は 631,091bp であった。さらに、HaploMerger2 を用いてフェージングした結果、アセンブリサイズは 526,415,149bp (約 526Mbp)、スキマホールド数は 1346、スキマホールド N50 は 1,561,226 bp (約 1.56Mbp)、BUSCO 解析におけるコア遺伝子セットの 96.3% (Single:88.0%, Double:8.3%) を網羅していることが明らかになった。以上から、ロングリードとショートリードのハイブリッドアセンブリによってブナゲノムの 99.4% をカバーするドラフトゲノムを構築することができた。現在、次世代シーケンサーを活用したメチル化分析技術の一つである HELP-tagging 法 (Suzuki et al. 2010, Genome Biol, 11:R36) のブナへの適用可能性を確認する実験を行っており、これまでの研究成果によって次世代シーケンサーによって生じる大量のリードをドラフトゲノムにマッピングすることで高い精度でゲノム中のメチル化部位を特定することが可能となったため、樹木のゲノム変異を解明するための強力な情報基盤を整備することができた。

##### (2) ブナ天然林における非中立性を示す一塩基多型の探索

7 座のマイクロサテライトマーカーを用いてブナ成木集団 (166 個体) の遺伝的構造を調査した結果、成木全体、下層木、上層木の全てのコレログラムにおいて 0~10m の距離階級で有意な正の共相係数が認められ、遺伝的構造の存在が示唆された。マイクロサテライト領域に挟まれた領域をゲノムワイドに探索して得られた SNP のコレログラムにおいてもマイクロサテライトマーカーと同様の傾向が認められた。ゲノムワイドに探索された SNP と乾燥応答の候補遺伝子である FcMYB1603 の遺伝子領域 (868bp) における SNP について非中立遺伝子座を検出する MSOD 分析を行った結果、下層木において FcMYB1603 上の SNP の 1 つである FcMYB1603\_684 が非中立遺伝子座として検出された (図 - 1)。そして、遺伝子座と 4 つの環境状態から算出された変数との相関関係を MSR 分析を用いて調べた結果、下層木の FcMYB1603\_684 とササ被度と関連付けられた NMDS 変数との間に有意な正の相関が認められ、FcMYB1603\_684 のマイナーアレルのヘテロ接合体を持つ下層木がササがあまり被覆していない場所に偏って分布していた (図 - 2)。

ブナ成木集団のマイクロサテライトマーカーのコレログラムにおいて、0~10m の近距離階級で遺伝的に類似した個体の集中分布が認められたことから、マイクロサテライトマーカーの遺伝的構造はブナの制限された種子散布を反映していると考えられた。ゲノムワイドに探索された SNP においても、コレログラムはマイクロサテライトマーカーと同様の傾向が認められ、さらに MSOD 分析では中立変異の空間分布からの逸脱は検出されなかったことから、ゲノムワイドに探索された SNP の遺伝的構造はマイクロサテライトマーカーと同様に、自然選択に中立な過程 (すなわち、遺伝子分散) によって形成されたと考えられた。成木集団における MSOD 分析では、下層木の FcMYB1603\_684 が非中立遺伝子座として検出され、MSR 分析ではササの被覆度と関連付けられた NMDS 変数と有意な相関が認められた。このことから、ブナ個体の土壌水分をめぐるササとの競争と乾燥応答性遺伝子 FcMYB1603 との関係性が推察可能ではあるが、一方、本調査では単一の集団に基づく結果であるため、今後、複数の集団におい

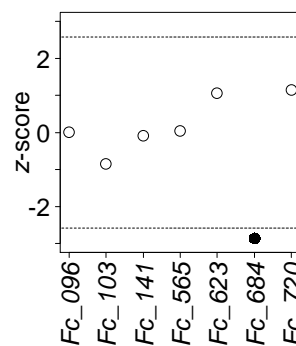


図 - 1 ブナ集団における中立な遺伝的変異の空間分布パターンからの逸脱の程度。Fc\_ : FcMYB1603 内の一塩基多型 (SNP) 遺伝子座。点線の内部は 99% 信頼区間、はそこから有意に逸脱した値を示す。

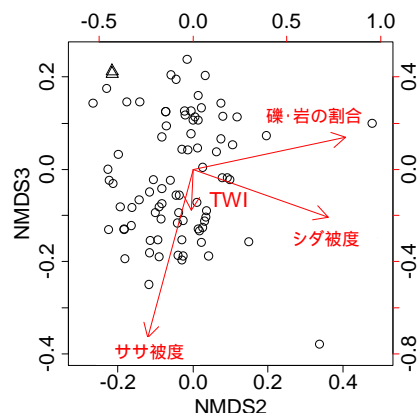


図-2 SNP 遺伝子型の分類。シンボルは FcMYB1603\_684 遺伝子座におけるヘテロ接合体 (○) とホモ接合体 (△) を表し、矢印は非計量多次元尺度法に基づく変数 (NMDS2 と NMDS3) と環境変数の相関関係を表す。

ても同様の傾向が認められるか検証する必要性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Torimaru Takeshi, Akada Shinji, Ishida Kiyoshi, Narita Machiko, Higaki Daisuke	4. 巻 23
2. 論文標題 Species habitat associations in an old-growth beech forest community organised by landslide disturbances	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Forest Research	6. 最初と最後の頁 98 ~ 104
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi.org/10.1080/13416979.2017.1396418	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Torimaru Takeshi, Suzuki Sei, Matsushita Michinari, Matsuyama Nobuhiko, Akada Shinji	4. 巻 91
2. 論文標題 Effects of soil properties and clonal growth on the apparent sex ratio of the flowering stems of the dioecious clonal shrub Aucuba japonica var. borealis growing in an evergreen coniferous secondary forest	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Acta Oecologica	6. 最初と最後の頁 91 ~ 100
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi.org/10.1016/j.actao.2018.07.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 上田 衛, 鳥丸 猛, 長谷川幸子, 宮武新次郎, 坂本 竜彦	4. 巻 45
2. 論文標題 三重県津市における市街地緑地と都市近郊林の鳥類相の比較	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 三重大学大学院生物資源学研究所紀要	6. 最初と最後の頁 1 ~ 10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 塚本将司・鳥丸猛・木佐貫博光・赤田辰治・戸丸信弘
2. 発表標題 白山国立公園刈込池におけるブナ天然林の遺伝的変異と遺伝構造
3. 学会等名 第8回中部森林学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 塚本将司・鳥丸猛・木佐貫博光・赤田辰治・戸丸信弘
2. 発表標題 マイクロサテライトマーカーと一塩基多型を用いたブナ集団内の遺伝的構造
3. 学会等名 第130回日本森林学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三須直也・内山憲太郎・上野真義・鳥丸猛・戸丸信弘
2. 発表標題 RADシーケンスを用いたブナの地理的変異の検出
3. 学会等名 第130回日本森林学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 赤田辰治・大宮泰徳・鳥丸猛
2. 発表標題 ブナにおける窒素栄養応答性遺伝子の解析
3. 学会等名 第130回日本森林学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 塚本将司・鳥丸猛・赤田辰治
2. 発表標題 ブナにおけるR2R3MYB遺伝子ファミリーの塩基多型の探索
3. 学会等名 第129回日本森林学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 赤田辰治・福井忠樹・鳥丸猛・大宮泰徳
2. 発表標題 ブナの傷害誘導性MYB3202プロモーターのメチル化修飾
3. 学会等名 第129回日本森林学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 日下部玄・鳥丸猛・石田清
2. 発表標題 ブナ・アオモリトドマツの成木は雪を介して稚樹の分布に影響を与えるか-林内の積雪分布を用いた検証-
3. 学会等名 第65回日本生態学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山本健太郎・鳥丸猛
2. 発表標題 大山隠岐国立公園におけるブナ老齢林のブナ稚樹の空間分布
3. 学会等名 第7回中部森林学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 塚本将司・鳥丸猛・木佐貫博光・赤田辰治・戸丸信弘
2. 発表標題 白山国立公園刈込池周辺の天然林に生育するブナの成木・稚樹集団のMYB遺伝子領域におけるSNPの空間分布
3. 学会等名 第9回中部森林学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 塚本将司・鳥丸猛・木佐貫博光・赤田辰治・戸丸信弘
2. 発表標題 白山国立公園刈込池内の天然林におけるブナの成木・稚樹集団の遺伝的構造
3. 学会等名 第131回日本森林学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤森悠菜・内山憲太郎・三須直也・後藤晋・高橋誠・鳥丸猛・戸丸信弘
2. 発表標題 ブナのRADシーケンシングを用いたゲノムワイド関連解析
3. 学会等名 第131回日本森林学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三須直也・内山憲太郎・鳥丸猛・中尾勝洋・戸丸信弘
2. 発表標題 RADシーケンシングによるブナの適応的な遺伝子の探索
3. 学会等名 第131回日本森林学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鳥丸猛・赤田辰治・石田清
2. 発表標題 白神山地のブナ天然林の森林動態のサイト間比較
3. 学会等名 第131回日本森林学会大会
4. 発表年 2020年



1. 発表者名 赤田辰治・鳥丸猛
2. 発表標題 ブナにおける窒素代謝関連遺伝子群の解析
3. 学会等名 第131回日本森林学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鳥丸猛・寺倉千晴・赤田辰治
2. 発表標題 白神山地ブナ天然林におけるリターフォール量の季節変化
3. 学会等名 第67回日本生態学会大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	赤田 辰治  (Akada Shinji)	弘前大学・農学生命科学部・准教授  (11101)	ブナのMYB遺伝子領域の分析技術への協力
研究協力者	戸丸 信弘  (Tomaru Nobuhiro)	名古屋大学・生命農学研究科・教授  (13901)	ブナのドラフトゲノム構築への協力