

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：82105

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14494

研究課題名(和文)耐寒性からアスナロ属2変種の太平洋側・日本海側気候への適応分化を推定する

研究課題名(英文) Estimating adaptive differentiation between two varieties of the genus *Thujopsis* to Pacific side / Japan Sea side climate based on cold tolerance characteristics

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・主任研究員 等

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)：ヒノキ科アスナロ属は日本の固有属であり、主に太平洋側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。両変種の冬季の耐寒性に差があるという仮説を検証したところ、低温順化中の11月から3月前半には差が検出されず、当初の仮説は否定された。一方9月から10月、および3月後半の耐寒性はわずかにアスナロが高く、アスナロ属では低温順化の前段階および脱順化後の段階で生育地への局所適応が起こっている可能性が示唆された。糖分析では産地間差が見られなかった。また発現遺伝子による比較を行うため、詳細なアノテーションを行なったcDNAデータベースを整備した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

冬季の耐寒性と糖含有量に変種間差が見られなかったことから、両変種の分化は冬季の低温に対する適応に起因するという仮説は否定された。一方、低温に順化していない期間の耐寒性にわずかな差が見られたことから、アスナロ属の変種の分化には仮説と異なる環境要因への適応、もしくは集団の隔離等の歴史的経緯が関わっている可能性が示された。本研究で整備されたcDNAデータベースは、今後多様なアスナロ属の遺伝学的研究、ひいては育種等に应用することができる。

研究成果の概要(英文)：Genus *Thujopsis* is endemic to Japan and consists of two varieties: *T. dolabrata* var. *dolabrata*, which is distributed mainly on the Pacific side, and *T. dolabrata* var. *hondae*, which is distributed mainly on the Sea of Japan side. Testing the hypothesis that there is a difference in winter cold tolerance between the two varieties, no difference was detected from November to early March during cold acclimation, thus rejecting the initial hypothesis. On the other hand, *T. dolabrata* var. *dolabrata* presented slightly higher cold tolerance in September-October and late March, suggesting that local adaptation to the provenance may occur at the preacclimation and the deacclimation stage. Sugar content analysis did not show any difference among the provenances. In addition, a *T. dolabrata* cDNA database with detailed annotations was developed for future use of comparison by expressed genes.

研究分野：森林遺伝学

キーワード：アスナロ ヒノキアスナロ 産地試験 低温順化 発現解析 糖分析

### 1. 研究開始当初の背景

アスナロ属はヒノキ科ヒノキ亜科に含まれる日本の固有属であり、1種2変種で構成される。基準種アスナロ(図1斜線)は、山形および宮城以南の冬季に乾燥する太平洋側に広く分布する。また変種ヒノキアスナロ(別名ヒバ; 図1灰色)は能登半島、佐渡島、および群馬以北に分布し、日本海側の多雪地帯が分布の中心である(倉田 1964)。近年ではアスナロ属の系統地理的研究が発展し、両変種には顕著な遺伝構造が存在することがわかってきた(Takahashi et al. 2001, 2003; 佐藤ら 2015)。一方で両変種は球果や葉の形態が異なるとされているが差はわずかであり、形態のみで区別することは難しい。したがって、両変種が太平洋側と日本海側の異なる環境に対しどのような戦略で適応してきたのかを解明するためには、生理学的な特性からその差異を調べる必要がある。

樹木で一般に気候による分化が見られる生理学的な形質として耐寒性がある。秋から冬にかけて日長の短縮と気温低下という環境変化を感知することで、温帯以北に分布する常緑樹では冬季の強光への防御、休眠、糖類の蓄積といった低温へのストレス耐性が獲得される(宇梶・原 2007)。中でも糖類は樹木の耐寒性が上昇するに当たって蓄積されることが知られている(Welling & Palva 2006)。アスナロ属では緯度による気温低下タイミングの違い、および太平洋側と日本海側の降雪量の差が原因となって、耐寒性上昇のパターンと真冬の耐寒性の高さに変種間の差異が存在するのではないかと予想される。このような植物の生理学的な形質の多くは遺伝子発現によって制御されており、その分子

的基盤を理解するためには遺伝子発現の量とパターンを調べる必要がある。遺伝子発現解析では、全RNAの塩基配列を取得する手法(トランスクリプトーム解析)がトレンドとなっている(Mackay et al. 2012)。トランスクリプトーム解析の強みは、タンパク質コード領域の塩基配列をピンポイントで読み取るため、ゲノム情報が未整備の非モデル植物、中でもゲノムサイズが非常に大きな針葉樹の遺伝解析に向いている点である(Parchman et al. 2010; Strickler et al. 2012)。この手法を採用することによって、耐寒性に関連する遺伝子の発現変異を網羅的に調べることができる。

応募者はこれまでに、RNA-seqによってアスナロ属個体から発現データを取得し(石川産 1個体 408,388 contigs 他; 2016-17年度科研費若手B; 稲永ら 2017)、トランスクリプトーム解析に必須のcDNAデータベース整備を進めている。データベース整備によって発現遺伝子の詳細なマッピングが可能となり、多検体の比較が行える環境が整いつつある。そこで次のステップとして、複数個体における季節をまたいだ多回数のサンプリングを行い、「遺伝子発現」と「耐寒性に関連する生理学的な形質」の季節変動を変種間で同時に比較することが有効である。



図1. アスナロ(斜線)とヒノキアスナロ(灰色)の分布域、林(1960)を元に作成

### 2. 研究の目的

本研究では、非モデル生物の針葉樹であるアスナロ属の適応分化について解明するため、耐寒性という形質に着目し、発現解析による遺伝的側面と糖の蓄積という生理的側面の両者から解析を行う。得られる成果から、アスナロ属が太平洋側-日本海側という大きく気候が異なる地域に対しどのように適応してきたのか、耐寒性という新しい切り口で理解することを目指す。

### 3. 研究の方法

(1) 試料採取: 林木育種センター構内(茨城日立市)に植栽されているアスナロ(岐阜産)およびヒノキアスナロ(福島産)各4個体を使用した(図2)。以下では、アスナロを岐阜



図2. 実験に使用したアスナロ個体の植栽の様子

表1. 調査日一覧

2018年	9月	3日
	9月	20日
	10月	1日
	10月	17日
	10月	29日
	11月	20日
	12月	12日
2019年	1月	23日
	2月	18日
	3月	6日
	3月	18日
	4月	15日

産個体、ヒノキアスナロを福島産個体と表記する。当該調査地は全個体が同一環境下に植栽されている共通圃場であり、同一気候下で遺伝子発現の産地別変異を比較できる。耐寒性の獲得過程を観察するため、2018年9月から2019年4月に渡って12回採取した(表1)。耐凍性が上昇する前の気温が高い晩夏(9月)から、完全に休眠し最も耐凍性が高くなる厳冬期(2月前後)を経て、休眠が解除され成長を再開するとともに耐凍性が低下する早春(4月)までを継続的に調

査するために、調査日程を決定した。

(2) 耐凍性試験：耐凍性獲得の指標として、電解質漏出法による耐凍性試験を行う。葉組織をプログラムフリーザーで凍結・融解させ、各時点、各個体の細胞致死率50%となる温度(LT<sub>50</sub>)を算出し、耐凍性の季節変化を追跡した(図3)。

(3) 糖分析：5種類の可溶性糖類(アラビノース・フルクトース・グルコース・スクロース・ラフィノース)の変動を測定し、耐凍性の上昇との相関について調べた。葉試料を液体窒素で粉碎し、70%エタノールによって糖類の抽出を行った。高速液体クロマトグラフィー(HPLC)によって試料に含まれる糖類の種類と含有量を推定した。試料には耐凍性の上昇前にあたる9月20日、耐凍性の上昇期間にあると予想された10月17日、11月20日、および最も耐凍性が高まると予想された1月23日の4時点の葉を使用した。



図3. 耐凍性試験における葉サンプルの低温処理

(4) トランスクリプトーム解析：本項目では当初の計画を変更し、変種間の遺伝子発現パターンを比較するためのcDNAデータベースの改良に注力した。ヒノキアスナロRNA-seqデータ(2016-17年度科研費若手Bにて取得)を対象とし、コンティグ配列(ショートリードの塩基配列を貼り合わせて作成された大きなDNA断片配列)に含まれるタンパク質コーディング領域を検出してその情報を付与した(アノテーション)。また、種子植物以外の生物のタンパク質のみがアノテーションされた配列を取り除くことで、アスナロ属のタンパク質をコードしていると予想される遺伝子の配列情報のセットを取得した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 耐凍性試験

本研究で使用した岐阜産個体および福島産個体間では、耐凍性の上昇および低下するタイミングには差が見られなかった(図4)。しかし、9月、10月、3月のLT<sub>50</sub>は、統計的に有意ではないものの岐阜産個体の平均値が福島産個体よりも低い傾向があり、4月では有意に岐阜産個体の値が低かった(t検定、 $p < 0.05$ )。すなわち、上記の期間では岐阜産個体の耐凍性が福島産個体より高かった。各産地の気象条件を検討したところ、各月の最深積雪深(平年値)が福島において若干高いため、積雪による保温がより効果的に行われていると考えられる福島由来の集団では、遺伝的に耐凍性が低い可能性がある。

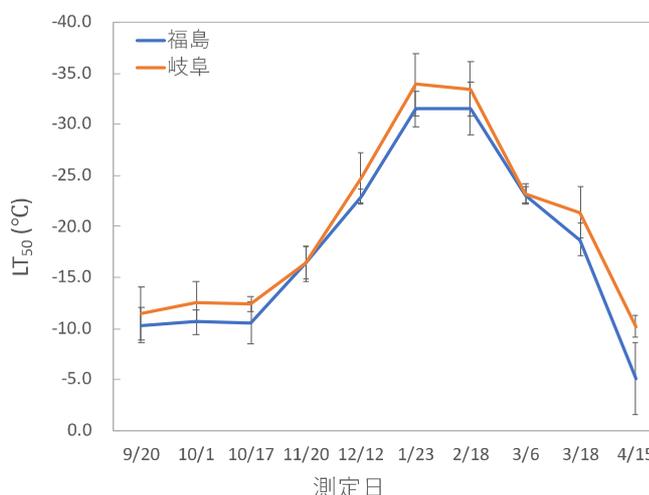


図4. 岐阜産個体および福島産個体のLT<sub>50</sub>の季節変動

##### (2) 糖分析

全ての糖で9月~1月にかけて含有量が増加した(図5)。樹木の低温順化では2段階のプロセスが起こると考えられている(Weiser 1970; Holliday et al. 2008)。段階Iでは晩夏の短日条件への反応、成長の停止と休眠誘導が起こり耐寒性が徐々に上昇する。続いて段階IIでは、気温が氷点下に達することで急激に耐寒性が上昇するとされている。本研究の結果では糖類は11月以降に大幅に含有量が増加したが、これは12月に最低気温が0℃を下回ることで低温順化の段階IIとなり、蓄積が進んだと考えられる。また、全ての糖で含有量とLT<sub>50</sub>の高い負の相関が観察された(図6)。特にフルクトース、グルコース、スクロース、ラフィノースは相関が高く、耐凍性が高くなるほど、糖含有量も高くなる傾向が見られた。一方、産地間差は検出されなかった。

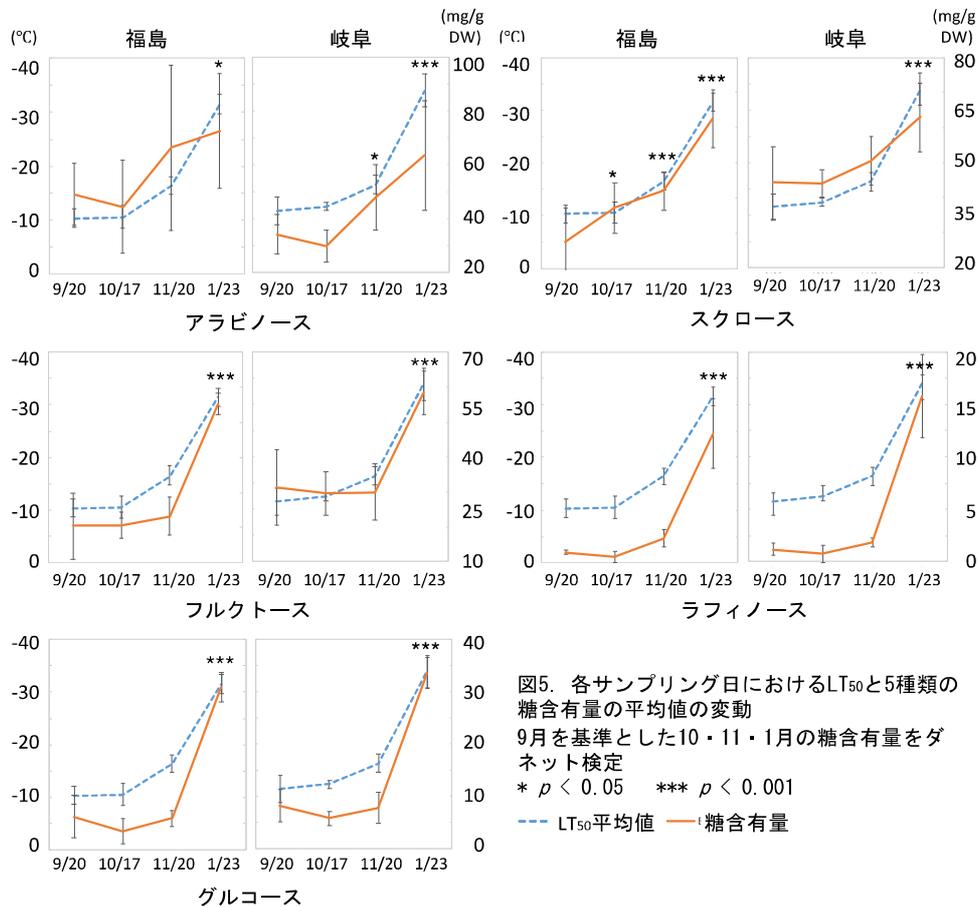


図5. 各サンプリング日におけるLT<sub>50</sub>と5種類の糖含有量の平均値の変動  
9月を基準とした10・11・1月の糖含有量をダネット検定  
\*  $p < 0.05$  \*\*\*  $p < 0.001$   
--- LT<sub>50</sub>平均値 — 糖含有量

### (3) トランスクリプトーム解析

cDNA データベースの改良では、アミノ酸長が 100 以上となる ORF (Open Reading Frame; タンパク質に翻訳される可能性のある DNA 配列) を検出し、BLASTP アルゴリズムを使用して詳細なアノテーションを行った。翻訳されたタンパク質配列の機能を Swiss Prot データベースとの比較によって推定するとともに、アノテーションされた ID を利用して Gene Ontology (種を超えて一般化された遺伝子の機能) および KEGG (遺伝子やタンパク質、代謝、シグナル伝達などの分子間ネットワークに関するデータベース) の検索を行った。続いて同じタンパク質をコードしていると予測される配列の重複と、種子植物以外の生物のアノテーションのみが付与された配列を除外したところ、81,395 個のコンティグ配列のセットが得られた。このデータベースをリファレンスとして各試料データをマッピングしたが、統計解析を期間中に完了することができなかった。

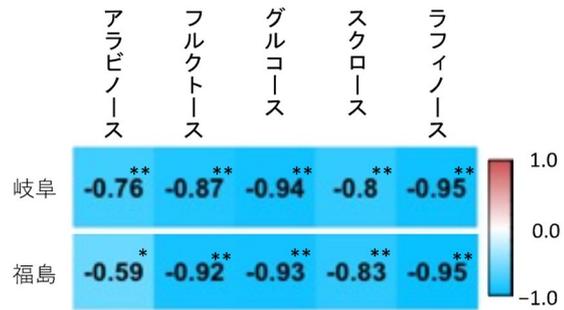


図6. LT<sub>50</sub>と5種類の糖含有量の平均値の相関係数によるヒートマップ \*  $p < 0.05$  \*\*  $p < 0.01$

#### < 引用文献 >

- 倉田悟 (1964) 原色日本林業樹木図鑑. 地球出版株式会社, 東京
- Holliday JA, Ralph SG, White R, et al (2008) Global monitoring of autumn gene expression within and among phenotypically divergent populations of Sitka spruce (*Picea sitchensis*). *New Phytologist* 178:103-122.
- Mackay J, Dean JFD, Plomion C, et al (2012) Towards decoding the conifer giga-genome. *Plant Mol Biol* 80:555-569.
- Parchman TL, Geist KS, Grahnen JA, et al (2010) Transcriptome sequencing in an ecologically important tree species: assembly, annotation, and marker discovery. *BMC Genomics* 11:180.
- 佐藤都子, 長谷川陽一, 三嶋賢太郎, 高田克彦 (2015) アスナロ属 (ヒバ, アスナロ) 天然林を対象とした EST-SSR マーカーによる遺伝構造解析. *日本森林学会大会発表データベース* 126:311.
- Strickler SR, Bombarely A, Mueller LA (2012) Designing a Transcriptome Next-Generation Sequencing Project for a Nonmodel Plant Species1. *Am J Bot* 99:257-266.

- Takahashi K, Nagahama S, Nakashima T, Suenaga H (2001) Chemotaxonomy on the leaf constituents of *Thujaopsis dolabrata* Sieb. et Zucc.—Analysis of neutral extracts (diterpene hydrocarbon). *Biochemical Systematics and Ecology* 29:839-848.
- Takahashi K, Nagahama S, Nakashima T, Suenaga H (2003) Chemotaxonomy on the leaf constituents of *Thujaopsis dolabrata* Sieb. et Zucc.—analysis of acidic extracts. *Biochemical Systematics and Ecology* 31:723-738.
- 宇梶徳史, 原登志彦 (2007) Expressed sequence tags (EST)から見た樹木の越冬戦略(<特集 2> エコゲノミクス: ゲノムから生態学的現象に迫る). *日本生態学会誌* 57:89-99
- Weiser CJ (1970) Cold Resistance and Injury in Woody Plants. *Science* 169:1269-1278.
- Welling A, Palva ET (2006) Molecular control of cold acclimation in trees. *Physiologia Plantarum* 127:167-181.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Inanaga Michiko, Hasegawa Yoichi, Mishima Kentaro, Takata Katsuhiko	4. 巻 11
2. 論文標題 Genetic Diversity and Structure of Japanese Endemic Genus Thujopsis (Cupressaceae) Using EST-SSR Markers	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Forests	6. 最初と最後の頁 935 ~ 935
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/f11090935	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 稲永路子、鈴木伸吾、工藤尚美、古賀泰雅、遠藤圭太、荒川圭太
2. 発表標題 アスナロ葉組織の低温順化過程における耐凍性および糖含有量の変化
3. 学会等名 第68回日本生態学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 稲永路子、平尾知士、高田克彦
2. 発表標題 アスナロ属葉組織における耐凍性関連遺伝子の発現解析
3. 学会等名 第132回日本森林学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 稲永路子、遠藤圭太
2. 発表標題 2産地に由来するアスナロの低温順化過程における耐凍性の変化の比較
3. 学会等名 第67回日本生態学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 稲永路子、平尾知士、高田克彦
2. 発表標題 アスナロ属の耐凍性関連遺伝子のプライマー開発
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 INANAGA Michiko, TAKATA Katsuhiko
2. 発表標題 RNA-seq analysis and de novo transcriptome assembly for detecting cold acclimation related genes in Thujopsis dolabrata var. Hondae
3. 学会等名 6th Plant Dormancy Symposium 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関