

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20380089

研究課題名(和文)

ブナ集団における適応的遺伝子の探索と生態的意義

研究課題名(英文)

Searching of candidate genes for adaptation in *Fagus crenata* populations and their ecological significance

研究代表者：

戸丸 信弘 (NOBUHIRO TOMARU)

名古屋大学・生命農学研究科・教授

研究者番号：50241774

研究成果の概要(和文)：本研究では、ブナにおける核の発現領域の変異を調べて、適応的遺伝子の探索を試み、その変異の生態的意義を検討することを目的とした。ブナのESTライブラリーを用いて合計169個の遺伝マーカーを開発した。日本海側と太平洋側の集団を対象として、設計したプライマーを用いて発現領域の塩基配列を決定し、その変異を明らかにした。適応的変異を示唆する遺伝子座は検出されなかったが、歴史的な集団サイズの増加が示唆された。明らかとなった集団遺伝構造から日本海側と太平洋側の集団は別々に保全管理すべきであることが確認された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to search candidate genes for adaptation by examining the variation at nuclear expressed regions in *Fagus crenata* and address ecological significance of the variation. We developed a total of one hundreds and sixty-nine genetic markers using the library of expressed sequence tags. We evaluated nucleotide variation at the targeted expressed regions in the populations on the Sea of Japan and Pacific sides of Japan, by sequencing with the designed primers for the genetic markers. Although no loci indicating adaptive variation were detected, the nucleotide variation suggests historical population expansion. The population genetic structure we found confirmed that *F. crenata* populations should be managed separately between the Sea of Japan and Pacific sides of Japan.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
2009年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2010年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
総計	14,100,000	4,230,000	18,330,000

研究分野：森林遺伝学

科研費の分科・細目：森林学・森林科学

キーワード：ブナ、EST、核遺伝子、塩基配列変異、中立的変異、適応的変異、集団遺伝構造、遺伝的多様性

1. 研究開始当初の背景

自然選択によって生じる地理的分化は、適応的な形質にみられ(もちろん後者の要因の

影響も受ける)、樹木の場合では、冬芽形成や開芽の時期、耐冬性などの形質で報告がある(たとえば Hurme et al. 1997)。しかし、

適応的な形質の地理的分化は、樹木の場合、表現型のレベルでも多くはなく、遺伝子や DNA のレベルにいたってはあまり調べられていないのが現状である。一方、遺伝的浮動と遺伝子流動のバランスによって生じる地理的分化は、自然選択に対して中立な遺伝マーカーで調べることができ、樹木の場合でもアイソザイムや DNA マーカーを用いて、その地理的分化が盛んに調べられてきた (Tsumura 2006)。

さて、わが国の樹木において地理的分化の解析が行われ、最も多くのデータ蓄積があるのは、針葉樹ではスギ、広葉樹ではブナである。ブナの形態的・生理的形質には、明瞭な地理的分化があり、たとえば、南から北に向かって葉面積は大きく (萩原 1977)、反対に堅果サイズは小さくなり (Hiura et al. 1996)、開芽期は南から北に向かって早まる (橋詰 1996) というクラインがみられる。これらの変異は、環境の影響だけでなく遺伝的な支配を受けていることが産地試験の結果から示され、気温や降水量、光環境などの環境に反応した遺伝的変異と考えられている。一方、我々の研究グループを中心に、自然選択に対して中立であるオルガネラ DNA マーカーやアイソザイムによってもブナの地理的分化が調べられてきた。オルガネラ DNA (ミトコンドリア DNA、葉緑体 DNA) の解析では、強い地理的構造がみられ (Tomaru et al. 1998; Koike et al. 1998; Fujii et al. 2002; Okaura and Harada 2002)、主に日本海側に分布する系統と太平洋側に分布する系統とに分化していることが明らかとなった (Fujii et al. 2002)。また、核ゲノムの遺伝子にコードされるアイソザイムの解析では、オルガネラ DNA の変異のように日本海側と太平洋側に分かれることはなかったが、北東集団の方が南西集団よりも集団内変異が低く、遺伝的分化も低いという地理的傾向が明らかとなった (Tomaru et al. 1997)。

我々の研究グループでは、核ゲノムのマイクロサテライト (SSR) マーカーを用いて、ブナの地理的変異を解析した。その結果、核ゲノムにおいても日本海側系統と太平洋側系統に完全に分化していることが示唆された。この 2 つの系統の地理的分布は、日本海型ブナ林と太平洋型ブナ林の分布とほぼ一致した。ブナ林植生が日本海側と太平洋側で異なる現象 (背腹性) の原因は、特に冬の積雪量の違いである (本間 2003)。対照的な気象環境をもたらす脊梁山脈は、同時に日本海側集団と太平洋側集団の間の遺伝子流動を妨げる地理的障害と考えられる。この地理的障害は、日本海側系統と太平洋側系統の分化を促したと考えられるが、これらの 2 つの系統は、現実に、異なる環境にさらされている。したがって、これらの 2 つの系統はそれぞれ

の環境に適応していると考えられ、その適応は何らかの遺伝子の発現によってもたらされていると考えるのが自然である。また、その適応的遺伝子には、太平洋側と日本海側などの間で地理的な分化がみられるのである。

わが国の樹木の中では、ブナは、最も地理的分化のデータが蓄積されている樹種の一つであり、さらに適応形質、中立形質ともに明らかにされた地理的分化は著しく明瞭なものである。したがって、わが国の樹木の適応性研究としては、ブナを研究対象とするのが最適であり、モデル研究となる可能性を秘めている。

2. 研究の目的

本研究では、樹木の適応進化を理解するために、ブナにおける核の発現領域の変異を調べて、適応的遺伝子の探索を試み、その変異の生態的意義を検討することを目的とした。具体的な目的は以下の通りとした。

(1) EST をベースとしたマーカーの開発

ブナの EST (expressed sequence tag) を用いて、① EST-SSR (EST-simple sequence repeat) マーカーの開発、② SNP (single nucleotide polymorphism) マーカーの開発、および③ダイレクトシークエンス法による塩基配列決定のためのプライマーの設計を行う。

(2) 塩基配列変異の評価および適応的遺伝子の探索

ブナの日本海側集団と太平洋側集団を対象として、③のプライマーを用いて塩基配列を決定することにより、塩基配列変異を評価するとともに、中立性の検定を行い、適応的遺伝子の探索を試みる。また、明らかとなった塩基配列変異が、これまでに中立マーカーで明らかになっているパターンと同様のパターンを示すかどうかを明らかにする。得られた結果をもとに、ブナ集団の保全管理のあり方を考察する。

3. 研究の方法

(1) EST をベースとしたマーカーの開発

① EST-SSR マーカーの開発

ブナの内樹皮から CTAB 法により全 RNA を抽出した。全 RNA をさらに精製し、Ueno et al. (2008) と同様に cDNA ライブラリーを作成し、EST を得た。EST 配列をもとにマイクロサテライトのプライマー対を設計した。

設計したプライマー対を用いて PCR を行い、PCR 増幅を確認した。明瞭な増幅がされたプライマー対を用いて多型性の調査を行った。ブナの分布域全体から 16 個体の DNA を用いて PCR を行い、3100 Genetic Analyzer を用いて遺伝子型を決定した。プログラム FSTAT (Goudet 1995) を用いて遺伝子座ごとに対

立遺伝子数とヘテロ接合度の観察値と期待値を計算し、HWE からの逸脱と連鎖不平衡の検定を行った。

②SNP マーカーの開発

ミズナラ、スダジイ、ブナの3種の内樹皮に由来するESTを対象にしてプライマー対を設計する候補となる配列を抽出した。候補配列をシロイヌナズナのゲノム配列(データベース TAIR)に対してアラインメントしエクソン領域を推定した。各樹種の配列を使用して、プライマー対(EPICプライマー対)を設計した。設計したEPICプライマー対を用いてブナDNAを鋳型にしてPCRを行い、産物が得られた場合には、ブナ16個体を用いてダイレクトシーケンス法により塩基配列決定を試みた。得られた塩基配列からSNPを検出した。各SNPについてSNP-SCALE法(Hinten et al, 2007)によるプライマーを設計した。設計したプライマーを用いてPCRを行い、増幅の確認後、3100 Genetic Analyzerを用いて遺伝子型を決定し、配列データと照合することによりプライマーのアレル特異性を確認した。

③ダイレクトシーケンス法による塩基配列決定のためのプライマーの設計

上記のブナ内樹皮由来のESTに加え、ブナ実生由来のESTを得た。ESTの総数は約6,000となった。公開データベース Gene および Swiss-Prot から植物の核遺伝子のアミノ酸配列を得た。これらの配列をクエリーとしてブナのESTに対してBLAST検索を行った。ヒットしたESTの中から有意性の高いESTを対象として、シロイヌナズナのゲノム配列(データベース TAIR)に対してアラインメントし、エクソン領域を推定した上で、プライマー対を設計した。設計したプライマー対を用いて、ブナの2~4個体のDNAを鋳型にPCRし、増幅が確認されたものについてダイレクトシーケンス法により塩基配列が得られるかどうかを調査した。

(2)塩基配列変異の評価および適応的遺伝子の探索

ブナの分布の北限から南限までの13集団(日本海側6集団、太平洋側7集団)を選定した。各集団から16個体の全DNAを試料とした。4.(1)③の発現領域の8遺伝子座について、設計したプライマー対を用いてPCR増幅し、ダイレクトシーケンス法で塩基配列を決定した。

配列データをハプロタイプデータに変換した。ハプロタイプデータからDNA多型のレベルを表すパラメータである多型サイト数(S)と塩基多様度(π , Nei and Li 1979)を算出した。また、中立性検定のパラメータであるTajimaの D (Tajima 1989)、Fu and Liの D^* (Fu and Li 1993)、Fu and Liの F^* (Fu

and Li 1993)を算出した。 F_{ST} (Hudson et al. 1992)を算出し、集団間の遺伝的距離($F_{ST}/(1-F_{ST})$)と各集団間の地理的距離(自然対数)の関係調べた。以上の計算はプログラムDnaSP(Librado and Rozas 2009)を用いて行った。

集団遺伝構造を評価するために、プログラムSTRUCTURE(Pritch et al. 2000)を用いてクラスタリング解析を行った。10,000回のburn-inの後に30,000回のサンプリングを、クラスター数(K)を1から10まで変化させ、それぞれの K につき10回反復を行った。これ以外の条件はデフォルトに従った。 K の増加に従って対数尤度が増加したために、対数尤度の変化率である ΔK (Evanno et al. 2005)を用いて最適な K を推定した。

4. 研究成果

(1)ESTをベースとしたマーカーの開発

①EST-SSR マーカーの開発

5,420個のESTが得られ、そのうちの3,317個がユニジェンとして推定された。ユニジェンの配列をもとに、マイクロサテライトのプライマーを270対設計し、そのうちの182対ではPCR産物が得られた。87遺伝子座は明瞭な多型を示し、対立遺伝子数は2~21、ヘテロ接合度の観察値と期待値はそれぞれ0.00~1.00と0.06~0.97であった。HWEからの逸脱も連鎖不平衡も検出されなかった。結果として、87個のEST-SSRマーカーが開発できた。

②SNP マーカーの開発

EPICプライマーを201対設計し、そのうち131対のプライマーでブナDNAを鋳型としてPCR産物が得られた。このうちの60対のプライマーによりブナ16個体のDNAを用いてシーケンスを行った。168個のSNPを検出し、それらに対してSNP-SCALE法によるプライマーを設計した。設計したプライマーを用いてPCRを行い、3100 Genetic Analyzerを用いて遺伝子型を決定し、配列データと照合した結果、21組のプライマーにおいてアレル特異性を確認された。多型性を調べたところ、ヘテロ接合度の観察値と期待値はそれぞれ0.00~0.50と0.06~0.48であった。結果として、21個のSNPマーカーが開発できた。

③ダイレクトシーケンス法によって塩基配列を決定するためのプライマーの設計

発現領域を増幅する61対のプライマーを設計した。そのうち14対のプライマーではPCR増幅を確認し、ダイレクトシーケンス法により塩基配列が決定できることを確認した。14遺伝子座の合計塩基数は6,847bp(エクソン3,872bp、イントロン2,975bp)であった。また、各遺伝子座の推定機能は、代謝や成長などに関するものであった。

(2)塩基配列変異の評価および適応的遺伝子の探索

各遺伝子座の塩基配列の長さは 272～613bp であり、合計 3317bp であった。全集団における各遺伝子座の S は 6～48、平均 25.5、 π は 0.047～0.490、平均 0.195 であり、遺伝子座間のばらつきは大きかったが、林木の既往研究において報告されている π の範囲に収まっていた。全遺伝子座における各集団の S の合計は 28 (大千軒岳)～54 (黒松内) であり、 π は 0.11 (天城山)～黒松内 (0.290) であった。アロザイムや核 SSR では、緯度や経度が高くなるにつれて集団内の遺伝的変異が低くなる傾向や、日本海側集団が大平洋側集団よりも遺伝的変異が低くなる傾向がみられたが、塩基配列変異ではそのような傾向はなく、北限の黒松内集団においても高い変異がみられた。

全集団の各遺伝子座で算出された中立性検定のパラメータである Tajima の D は、-1.073～-2.439 となり、最小値 (-1.073) 以外はすべて統計的に有意であった。7 遺伝子座において中立性は棄却されたが、すべての遺伝子座で負に偏っていることから、自然選択の影響ではなく、集団サイズの増加を示唆するものと考えられる。これは最終氷期以降の分布拡大と矛盾しないと考えられる。 D^* と F^* の値も有意性はほとんどみられなかったが、負に偏る遺伝子座が多かった。

集団間の遺伝的距離 ($F_{ST} / (1 - F_{ST})$) と各集団間の地理的距離 (自然対数) は正の関係があり、距離による隔離があることが示されたが、日本海側集団間および大平洋側集団間よりも日本海側と大平洋側の集団間で $F_{ST} / (1 - F_{ST})$ の値は高かった。また、STRUCTURE 解析により最適な K は 3 であり、クラスターの分布により日本海側と大平洋側の集団に明瞭に分割されていた。これは核 SSR 変異で明らかとなった日本海側と大平洋側の集団間の遺伝的分化と同様であった。したがって、既往研究で示唆されてきたように、日本海側集団と大平洋側集団は別々に保全管理すべきである。

今後、解析遺伝子座を増加させることにより、適応的変異を示す遺伝子座を検出することができるかと期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Hiraoka, K. and Tomaru, N. (2009) Genetic divergence in nuclear genomes between populations of *Fagus crenata* along the Japan Sea and Pacific sides of Japan. *Journal of Plant Research* 122:

269-282.

- ② Ueno, S., Taguchi, Y., Tomaru, N., and Tsumura, Y. (2009) Development of EST-SSR markers from an inner bark cDNA library of *Fagus crenata* (Fagaceae). *Conservation Genetics* 10: 1477-1485.

[学会発表] (計 3 件)

- ① 安部晃生, 上野真義, 鈴木節子, 津村義彦, 戸丸信弘 大平洋型ブナ集団における EST-SNP による集団遺伝学的解析. 第 120 回日本森林学会大会, 2009 年 3 月 29 日, 京都大学.
- ② 安部晃生, 鈴木節子, 上野真義, 吉田貴徳, 舘田英典, 津村義彦, 戸丸信弘 ブナの核発現遺伝子における塩基配列を用いた集団遺伝学的解析. 日本植物学会第 74 会大会, 2010 年 9 月 11 日, 中部大学.
- ③ 安部晃生, 鈴木節子, 上野真義, 吉田貴徳, 舘田英典, 津村義彦, 戸丸信弘 ブナの移住を伴う分化モデルにおけるパラメーターの推定. 2011 年 9 月 22 日, 京都大学.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

戸丸 信弘 (TOMARU NOBUHIRO)
名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授
研究者番号: 50241774

(2) 研究分担者

中川 弥智子 (NAKAGAWA MICHIKO)
名古屋大学・大学院生命農学研究科・准教授
研究者番号: 70447837

(3) 連携研究者

津村 義彦 (TSUMURA YOSHIHIKO)
独立行政法人森林総合研究所・森林遺伝研究領域・領域長
研究者番号: 20353774

上野 真義 (UENO SANEYOSHI)

独立行政法人森林総合研究所・森林遺伝研究領域・主任研究員
研究者番号: 40414479

(4) 研究協力者

鈴木 節子 (SUZUKI SETSUKO)
独立行政法人森林総合研究所・森林遺伝研究領域・研究員
研究者番号: 70456622

安部 晃生 (ABE KOSEI)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・院生