

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：82105

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K21344

研究課題名（和文）サクラクロン品種をモデルとした代謝エピゲノムによる樹齢推定

研究課題名（英文）Tree age estimation by metabolic epigenomics in clonal cultivar Cerasus as a model

研究代表者

松本 麻子（Matsumoto, Asako）

国立研究開発法人森林研究・整備機構・森林総合研究所・主任研究員 等

研究者番号：90353862

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：サクラ栽培品種“染井吉野”を対象に、加齢によるDNA修飾とそれに伴うメタボロームの変化を捉えることを目的として、エピゲノム解析を行った。北海道、関東、中部、九州で育成された個体でゲノム全体のDNAメチル化レベルを把握し、異なる環境下でメチル化レベルが変化していた遺伝子群について遺伝子オントロジー解析を行ったところ、メチル化レベルやメチル化を受けた遺伝子の機能的特徴には南北でクラインがみられた。同じ環境下で生育した異なる樹齢の個体間では、メチル化レベルに大きな違いは検出されなかった。接木等で増殖した個体の樹齢については、エピゲノムのリプログラミングの有無を明らかにする必要が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

長命な樹木種におけるゲノムのメチル化については不明なことが多いが、ヒトなどではすでに塩基配列の変異を伴わないエピジェネティックなDNA修飾が遺伝子の転写に影響を与え、細胞全体の生態にも影響し得ることが知られている。この研究課題は樹木がなぜ長寿で、加齢とともに樹体内ではどのような変化が起きているのか、そこにゲノムのメチル化がどう影響するかを明らかにする端緒となり、樹齢を推定するだけでなく、個体の健全性などの簡便な評価手法の開発につながる成果である。また、長命という生命現象を探る上での重要な知見となった。

研究成果の概要（英文）：Epigenomic analysis was conducted on the cherry cultivar Somei-Yoshino in order to understand DNA modifications and associated changes in the metabolome due to aging. The DNA methylation levels of the entire genome were determined for individuals grown in Hokkaido, Kanto, Chubu, and Kyushu, and gene ontology analysis was conducted for genes whose methylation levels changed under different environments. No significant differences in methylation levels were detected between individuals of different ages growing in the same environment. It was suggested that it is necessary to clarify the presence or absence of epigenomic reprogramming with respect to the age of individuals propagated by grafting or other means.

研究分野：森林遺伝

キーワード：エピゲノム サクラ クローン品種

1. 研究開始当初の背景

長命な樹木において、年月の経過とともに樹体内ではどのような変化が起きているのだろうか。エピゲノムは DNA の塩基配列の変化を伴わない遺伝的情報で、代表的な機構の一つが DNA のメチル化であり、多くの生物学的プロセスで重要な役割を果たしている。近年、ヒトなど哺乳動物では、加齢に伴い変動するゲノムのメチル化の影響で、細胞のがん化の誘発や、それに伴う揮発性物質など代謝物が変化することが分かっている。一方植物では、特に長命な樹木種において、同様の現象は捉えられていない。生命維持に重要な遺伝子において、加齢の過程で生じるエピジェネティックな変化(特にゲノムのメチル化)と、それに伴う遺伝子の不活性化現象については、具体的に捉えられていないのである。この、動物や草本植物等とは比較にならない程に長命な樹木の加齢の速度や寿命、健全性について、ゲノムのエピジェネティックな変化がどのように影響しているかは未知である。

‘染井吉野’は全国に数百万本も植栽される我が国の桜を代表する栽培品種である。挿し木で苗木が生産されているため、樹齢が異なる個体を解析することで、別々の個体であっても同一ゲノムであることを背景にしてエピジェネティックな変化をトレースできるのではないかと。

2. 研究の目的

サクラ属のクローン品種である“染井吉野”を対象に樹齢と代謝物の変化およびエピゲノムの関係を明らかにする。樹齢は異なるが塩基配列情報が同一であるクローン個体を用いることで、塩基配列情報が異なる影響を排除し、エピジェネティックな変化を定性的定量的に捉える。代謝物を対象とするメタボローム解析においても同様に、異なる樹齢の個体で定性的定量的に変化を捉える。エピゲノムとメタボロームの成果を統合することにより、樹木の樹齢や健全性の簡便診断手法の開発につなげる。

3. 研究の方法

接木増殖により育苗されたサクラ栽培品種“染井吉野”について解析を行った。異なる環境下での生育によるゲノムのメチル化のレベルや傾向を明らかにするために、九州(熊本県熊本市; KYS)、中部(静岡県三島市; NIG)、関東(茨城県つくば市; TKB)、北海道(札幌市; HKD)の樹齢が同程度(30年生前後)の個体から2019年の開花期に花組織を採取し、ゲノムのメチル化解析に用いた。生育環境による影響を排除し、樹齢の違いによるメチル化の傾向や程度を明らかにするために、茨城県土浦市の小学校で育成された樹齢117年の個体およびそれらから接木増殖して同じ敷地で育成した個体(19年生)から当年枝の本葉を採取した。DNAのメチル化検出には全ゲノムバイサルファイトシーケンシング(WGBS)法を用い、得られたゲノム配列をソメイヨシノのリファレンスゲノムにマッピングしてメチル化領域及び遺伝子のゲノム上の位置を明らかにした。WGBS法の原理は、バイサルファイト処理によりDNA中の非メチル化シトシン(C)はウラシル(U)に変換されるが、メチル化シトシン(mC)は変換されない。このC-Uの塩基置換率を区別することでDNAメチル化レベルを算出できるというものである。

揮発性物質については、生育環境の影響と品種の違いによる質的量的差異を明らかにするために、関東の3地点(茨城県つくば市、東京都八王子市、茨城県結城市)で栽培した“染井吉野”、“上旬”、“駿河台旬”の3栽培品種から5~8分開きの花組織を採取し、ガスクロマトグラフィー飛行時間型質量分析(GC-MS)を用いて揮発性物質を含む非ターゲットメタボローム解析を行った。なお、事前に採取試料から抽出したDNAを用いて、マイクロサテライトマーカーによる遺伝子型解析を行い、クローン性を確認した。

4. 研究成果

メチル化解析ではまず、生育環境が異なる“染井吉野”の個体でWGBSを行い、網羅的にDNAのメチル化領域を検出してゲノム全体のDNAメチル化レベルを把握するとともに、異なる環境下でメチル化レベルが変化していた遺伝子群について遺伝子オンロジー(GO)解析を行った。“染井吉野”の生育適地により近いとされる茨城県つくば市TKBを起点として、それぞれの生育地との比較を行ったところ、ゲノム全体のメチル化の割合は南北に移動するほど、CG、CHG配列のメチル化(mCG、mCHG)が増加し、CHH配列のメチル化(mCHH)が減少する傾向にあった。異なる環境下で生育した個体では、メチル化を受けた遺伝子の機能的特徴として、代謝物、ストレス・環境応答に関連する遺伝子群が多いことが明らかになった(図)。“染井吉野”のDNAメチル化には南北方向のクラインがあり、生育環境の違いが影響していると推察された。メチル化を受けた個々の遺伝子には生育地に特異的なものもあったことから、気候変動などによるエピジェネティックな変化が生じている可能性が示唆された。

同一環境下で生育した117年生2個体および19年生2個体を用いてWGBSを行い、メチル化レベルを比較した結果では、全メチル化領域数において老齢である117年生と若齢である19年生の個体間での大きな違いはなく、全メチル化領域に占めるmCG、mCHG、mCHHの割合も、老齢個体と若齢個体間で違いは見られなかった。この点から考えても、ゲノムのメチル化の

レベルは、加齢よりも環境の違いの影響が大きいと考えられた。一方で、樹齢が異なる個体におけるメチル化の影響を受けた遺伝子群については詳細解析が完了していないことから、加齢に伴ってメチル化された遺伝子の分析は今後の課題である。

メタボローム解析では、サクラの花に含まれる揮発性成分のアノテーション率を向上させるため、揮発性有機化合物ライブラリの充実を進めた。具体的には、エッセンシャルオイルライブラリーの分析を行い、検出された揮発性有機化合物のID化を行った。これにより、精油成分に含まれかつアノテーションがつかない未同定の化合物についても「実在する」揮発性有機化合物として扱うことが可能になった。公共データベースに散在している樹木を含む植物エピゲノムデータの再解析および比較解析に向けたメタデータ収集、解析パイプラインの構築したことで、今後メチロームとメタボロームの統合解析を進めることができる。

本研究課題では、サクラクローン品種では、生育環境が異なることによるメチル化レベルの違いが、加齢によって生じるメチル化レベルの違いよりも大きい傾向があることを明らかにした。一方で、この傾向は、挿し木等におけるエピゲノムのリプログラミングの有無が原因である可能性があり、加齢とゲノムのメチル化の関係を明確にし樹木の樹齢推定を可能にするには、さらなる解析が必要であると考えられた。

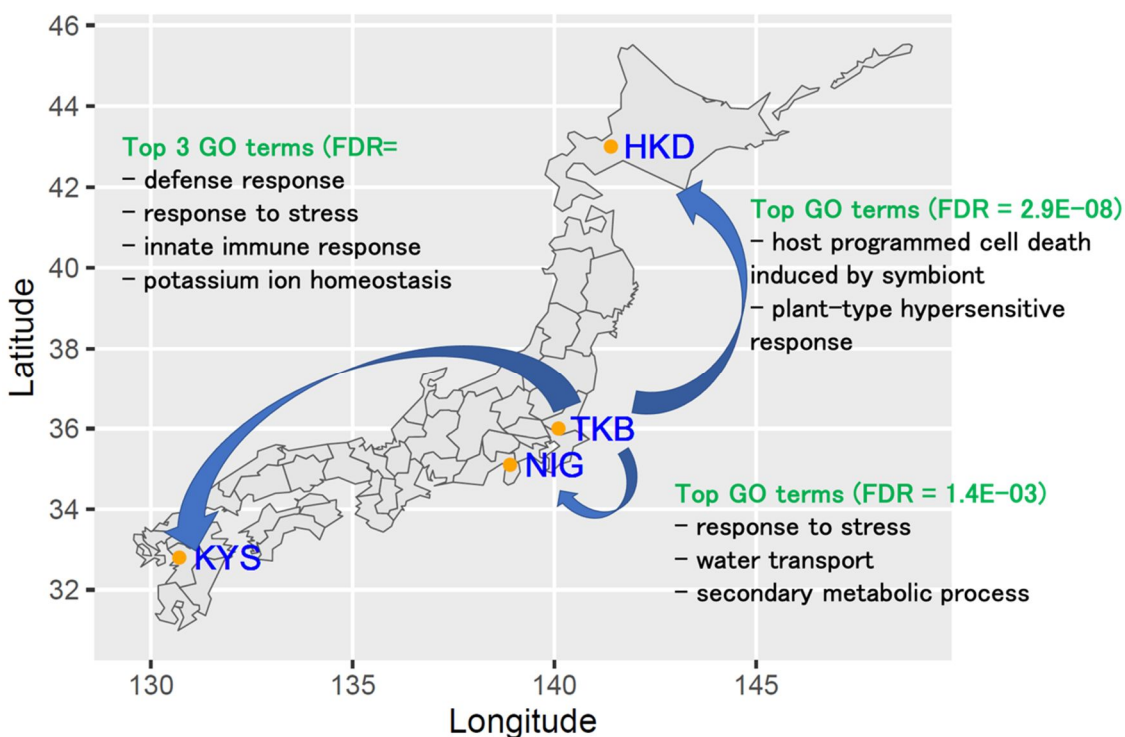


図 . CG メチル化(mCG)レベルに変化があった遺伝子の機能的特徴

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 松本麻子・川口晃平・福島敦史・加藤珠理・草野都・小林誠 |
| 2. 発表標題 生育環境の違いによる'染井吉野'の全ゲノムメチル化比較 |
| 3. 学会等名 第135回日本森林学会大会 |
| 4. 発表年 2024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 |
|-------|--|--|----|
| 研究分担者 | 草野 都 (Kusano Miyako) (60415148) | 筑波大学・生命環境系・教授 (12102) | |
| 研究分担者 | 福島 敦史 (Fukushima Atsushi) (80415281) | 京都府立大学・生命環境科学研究科・教授 (24302) | |
| 研究分担者 | 加藤 珠理 (Kato Shuri) (90467217) | 国立研究開発法人森林研究・整備機構・森林総合研究所・主任研究員 等 (82105) | |

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 |
|---------|---------|