

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月3日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22380080

研究課題名 北方針葉樹における環境適応の実態と遺伝的メカニズムの解明

研究課題名 Understanding of environmental adaptation and its genetic mechanisms in boreal conifers

研究代表者

後藤 晋 (GOTO SUSUMU)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：60323474

研究成果の概要（和文）：

近年、樹木種の環境適応とその遺伝的メカニズムが注目されている。本研究では、1200mの標高差を持つ東京大学北海道演習林において、以下の4つの研究を行った。(1) 多地点の毎木調査とGISで抽出した環境条件データから、主要針葉樹の資源分布と更新パターンを特定した。トドマツは低～中標高域、エゾマツは中～高標高域で資源量が多く、標高はトドマツ更新木の個体数に負の効果、エゾマツのそれに正の効果と及ぼしていることが明らかになった。(2) トウヒ属樹木が産生するフェノリクスとテルペノイドの生合成経路に着目し、標高分化と関連する適応的な遺伝子の探索を行った。フェノリクス生合成に関連する既知の遺伝子(*CHS*と*STS*)ではパターンの類似性が高くマーカー化が難しかったが、テルペノイド合成に関連する新規の遺伝子(*PAL*)について、トウヒ属で初めて塩基配列を解読し、マーカー化の可能性を開いた。(3) トドマツの標高間相互移植試験地を用いて、樹高と生存率が自生標高に適応的かどうかを評価した。その結果、自生標高から移植地までの標高差が大きいほど、生産力(樹高×生存率)が低下するホームサイト・アドバンテージが成り立つことを数理モデルによって検証した。また、耐凍性試験を行い、耐凍性獲得タイミングに標高間変異が存在することを示した。(4) トドマツ標高間の相互交雑試験地(低×低、低×高、高×低、高×高)において、繁殖形質と成長形質を調査し、個体の繁殖および成長に由来標高が及ぼす影響を調べた結果、高標高由来個体で繁殖量が有意に多く、低標高系で成長量が有意に大きいことが示された。

研究成果の概要（英文）：

Environmental adaptation and its genetic mechanisms of forest trees are recent topics in forest genetics. In this study, four studies have been conducted in the University of Tokyo Hokkaido Forest where has a 1,200-m altitudinal range. (1) We collected data of the basal area (BA) and the number of recruits for major conifers from field measurements with many plots and environmental condition from GIS analyses. We found that BA and regeneration of *A. sachalinensis* were dominant in low-mid elevation zones, whereas those of *P. jezoensis* were larger in mid-high elevation zones. (2) We examined adaptive genes derived from phenolix and terpenoids synthesis pathways to explain altitudinal differentiation. Previously-known *CHS* and *STS* genes related to phenolix showed similar patterns between high- and low-elevation trees. Then, we identified DNA sequences of *PAL* gene related to terpenoids in genus *Picea*. This sequence will be useful for developing adaptive gene markers for genus *Picea*. (3) We used a reciprocal transplant experiment along the altitude in *A. sachalinensis* and clarify whether tree height and survival rate are adaptive to native altitude. As altitudinal difference between native sites and transplanting ones increased, productivity (tree height × survival rate) decreased. Thus, home-site advantage is confirmed by the mathematical modeling. Freezing tests suggest that there is altitudinal variation in timing of cold acclimation. (4) We measured number of cones, height and diameter growth of F<sub>1</sub> trees consisting of a reciprocal hybridization test plantation with four genetic compositions (low×low, low×high, high×low and high×high elevation). We found that reproductive traits were significantly higher in high-elevation derived trees, whereas growth traits were higher in low-elevation derived trees.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	7,500,000	2,250,000	9,750,000
2011年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2012年度	2,100,000	630,000	2,730,000
年度			
年度			
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：林学・林学・森林工学

キーワード：標高，相互移植，局所適応，適応的遺伝子，GIS，繁殖形質

### 1. 研究開始当初の背景

同一山麓における標高間の著しい環境の違いは、天然の“実験”として捉えることが可能であり (Korner 2007)、古くから標高差を利用した環境適応に関する研究が草本を中心に行われてきた。樹木では、標高別相互移植試験地自体があまり設定されておらず、知見の集積が少ない。

東京大学北海道演習林では、1460m の標高をもつ大麓山の南西斜面を利用して、1975年に8標高域産のトドマツ種苗を6標高域に相互移植した世界的にも大規模な試験地が設定されている (倉橋・濱谷 1981)。エゾマツでは、1990年に7標高域産を2標高域に相互移植した試験地が設定されている (Nakagawa et al. 2003)。これらの試験地は既に繁殖時期に達しており、長期的な成長、繁殖、材質等の適応形質を測定し、環境適応について種間比較することが可能である。

また、トウヒ属では、適応的遺伝子に関連する EST が急速に蓄積されており、これらのゲノム情報を用いることで適応的遺伝子に関する遺伝マーカーを開発できる可能性が高い。

北海道演習林で大量に蓄積された毎木調査データからトドマツ、エゾマツ、アカエゾマツの分布を定量的に把握できることを着想した。北海道演習林全域の GIS を整備しており、各種の分布が適応的遺伝子以外の要因で決定されているとすれば、それらの要因を抽出することが可能である。

### 2. 研究の目的

近年、樹木種の標高に対する適応の程度やその遺伝的メカニズムが注目されている。東京大学北海道演習林には約 1200m もの標高差があり、主要な針葉樹について、異なる標高から採取した種苗を用いた標高間の相互

移植試験地が存在する。本研究では、この北海道演習林をフィールドとして、以下の4つの研究を行った。(1) 多地点の毎木調査と GIS を用いた環境解析から各地点の環境条件を抽出し、主要な北方針葉樹3種であるトドマツ、エゾマツ、アカエゾマツの分布特性を明らかにする。(2) 申請者らが有する北方針葉樹の適応的遺伝子に関する遺伝情報を活用し、自生標高 (特に、高標高) に適応的遺伝子をマーカー化する。(3) トドマツで既に設定された標高間相互移植試験地を用いて、成長と生存について自生標高に適応しているかどうかについて、数理モデルを用いて検証する。さらに、一部の試験地の個体の枝を採取として、時期別に耐凍性試験を行い、耐凍性獲得タイミングに標高間変異があるかどうかを明らかにする。(4) 低標高と高標高の相互移植試験地において、球果量と樹高と直径成長を測定し、各個体の遺伝組成 (低×低、低×高、高×低、高×高) が繁殖と成長にどのような影響を及ぼすかを調べる。

以上の研究成果をとりまとめ、北方針葉樹を対象にした標高の違いによる環境適応のプロセスと、それに伴う遺伝的基盤について明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 針葉樹3種の分布環境の定量解析

① 東京大学北海道演習林の施業実施区域 (14,884.2 ha) を対象に、標準地調査データ (n=3,214) と GIS を用いて主要針葉樹3種の天然分布域を定量的に把握した。また、② 同演習林の北東部に位置する大麓山斜面の天然林 (2,133 ha) を対象に、現地プロット調査 (n=125) と GIS を用いて主要針葉樹種の天然分布域を定量的に把握し、GIS を用いて標高など地形要因との関係を一般化線形混合モデル (GLMM) により解析した。さらに、

③同演習林内で択伐施業林 (5,110 ha) を対象に、標準地調査データ (n=1,382) を用いて針葉樹種の更新木分布に関する同様の解析を行った。

## (2) 適応的遺伝子マーカーの開発

トウヒ属樹木が産生するフェノリクスとテルペノイド双方の生合成経路に着目し、エゾマツ、アカエゾマツの苗から抽出した DNA を用いて、まず、フェノリクス生合成に関連する既知の *CHS*、*STS* 遺伝子を対象に、それぞれの特異的プライマーがマーカー遺伝子となり得る可能性を調べた。次に、テルペノイド生合成に関連する遺伝子 *PAL* ならびに 1,8-シネオール合成酵素候補遺伝子について、ゲノムクローニングを試みた。

## (3) 相互移植による標高適応の実態解明

トドマツとエゾマツで 1973 年に設定された標高間相互移植試験地の全個体を対象に、生存と樹高を測定した。これらの試験地では、8 標高産地の苗木が 6 標高域に植栽されており、自生標高と移植地の標高差に大きな変異がある。本研究では、生存率×平均樹高を生産力として定義し、この生産力を自生個体と移植個体と比較した。また、数理モデルを構築し、自生地と移植地の標高差が大きいほど生産力が下がる、ホームサイト・アドバンテージが見られるかどうかについて、定量的に調べた。

また、標高間相互移植試験地の一部から、10 月中旬、10 月下旬、11 月中旬の 3 回に分けて枝を採取し、北海道大学低温研究所で  $-30^{\circ}\text{C}$  と  $-15^{\circ}\text{C}$  に 4 時間暴露する凍結試験を行った。試験から 2 週間チャンバー内で育成した後、針葉の褐変度を評価することにより、耐凍性獲得タイミングに産地標高が影響しているかどうかを検証した。

## (4) 遺伝的組成が繁殖と成長に及ぼす影響

高標高と低標高由来個体を交雑させたトドマツ F<sub>1</sub> 個体群から低×低、低×高、高×低、高×高の各 6 個体を選び、開花フェノロジー調査、球果数の計測、樹高および胸高直径の 7 年間の年平均成長量の測定を行い、個体の繁殖および成長に由来標高が及ぼす影響を調べた。また、葉から RNA を抽出し、季節ごとの花成遺伝子の発現量が由来標高で異なるかどうかをリアルタイム RT-PCR 法による定量分析で試みた。

## 4. 研究成果

### (1) 針葉樹 3 種の分布環境の定量解析

結果は以下のとおりである。①トドマツは調査地西側と中央部の低～中標高域 (300-500 m) で、エゾマツは東側の中～高標高域

(400-800 m) で、それぞれ個体数が多くなる傾向が認められた (図 1)。すなわち、これらの 2 種の分布は一部重なり合うものの、主に標高を軸にしてニッチ分化していることが定量的に示された。アカエゾマツは北東側に比較的多く分布する一方、南～南東側ではほとんど出現しなかった。②トドマツとエゾマツは山頂近くを除くほぼ全ての調査プロットで観察された。アカエゾマツの出現率は 33% であった。GLMM 解析の結果、標高がトドマツとエゾマツの個体数に負の効果、アカエゾマツの個体数に正の効果と及ぼしていた。傾斜度はエゾマツの個体数に負の効果、アカエゾマツの個体数に正の効果を持っていた。③GLMM 解析の結果、標高はトドマツ更新木の個体数に負の効果、エゾマツ更新木の個体数に正の効果と及ぼしていた。

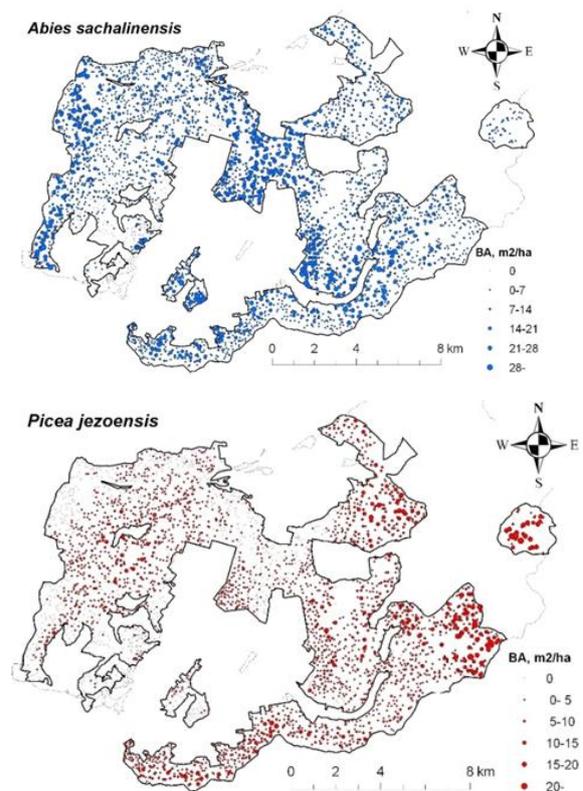


図 1. 調査地におけるトドマツ (上) とエゾマツ (下) の BA 分布

## (2) 適応的遺伝子マーカーの開発

フェノリクス生合成では、*CHS* および *STS* 遺伝子の共通プライマーを用いたところ、パターンの類似性が高く標高分化のマーカー遺伝子となり得る可能性は低いと考えられた。今回トウヒ属樹木で初めて検出された *PAL* 候補遺伝子はイントロンを有していなかった。また活性中心に相当する塩基配列が見られ、*Pinus massoniana* などマツ属の *PAL* 遺伝子と約 90% の相同性があった。また、アカ

エゾマツからも同様の *PAL* 遺伝子をクローニングすることができた。テルペノイド生合成では、1,8-シネオール合成酵素候補遺伝子は少なくとも9個のイントロンを有していることが分かった。また現在解析できた部分配列では、他のトウヒ属樹木の既知の遺伝子と約95%の相同性があり、*PAL* ならびに1,8-シネオール合成酵素候補遺伝子の情報を遺伝子マーカーの開発に応用可能性を見出すことができた。

### (3) 相互移植による標高適応の実態解明

トドマツの相互移植試験地で得られた樹高と生残の長期データを数理モデルで解析した結果、自生地と移植地の標高差が大きくなるほど生産力（樹高×生存率）が低下するホームサイト・アドバンテージが認められた。同じ標高差であっても、上方に移植する時の方がより大きく、移植方向によって自生地の有利性が異なるという新しい知見も得られた（図2）。

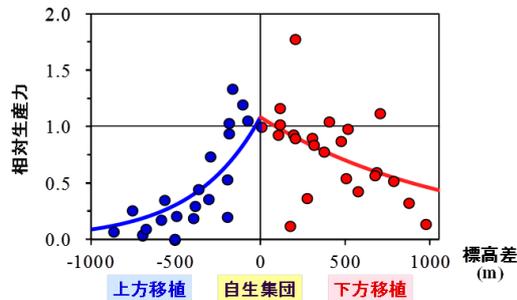


図2. 自生集団（標高差=0）の生産力を1としたときの移植集団のパフォーマンス

凍結試験の結果、産地標高が高いほど、耐凍性を早く獲得していることが判明した。産地ごとの低温要求量と耐凍性獲得タイミングの関係を調べた結果、産地標高が340mと1200mでは低温要求量が異なり、1200m産の方が早い時期に耐凍性を獲得していた（図3）。すなわち、秋季のフェノロジーが環境適応に重要であることが示唆された。

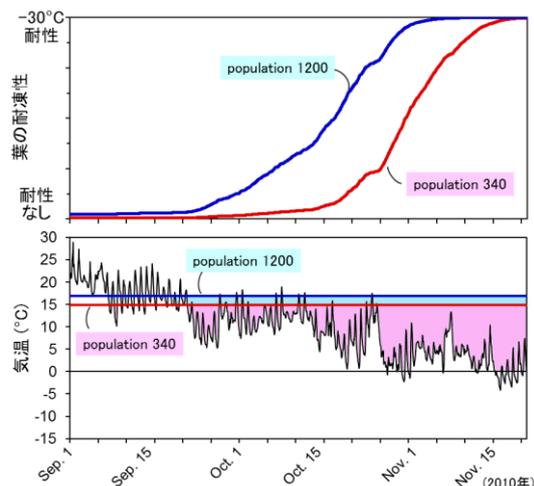


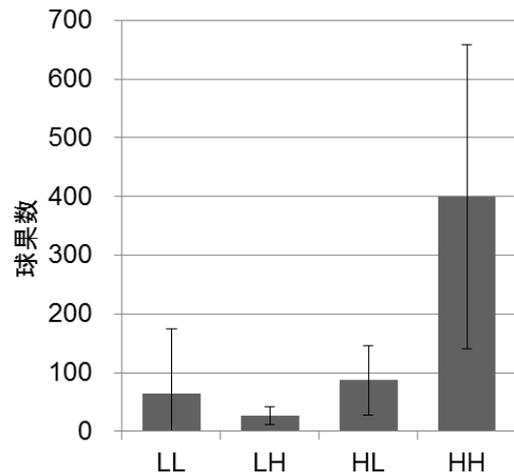
図3. 葉の耐凍性の季節変化（上）と耐凍性獲得に必要な閾値気温（下）、ならびにそれらの集団間変異（標高340m, 1200m 集団）

### (4) 遺伝的組成が繁殖と成長に及ぼす影響

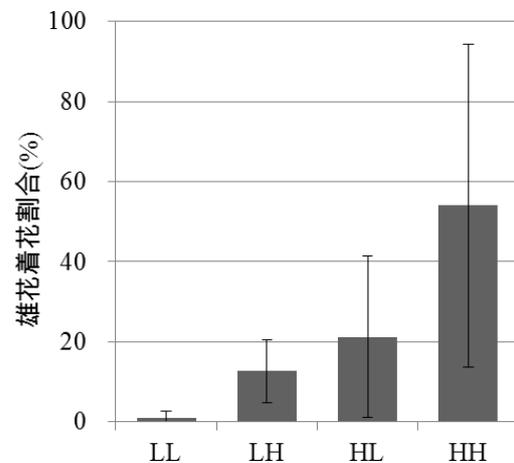
由来標高の異なる個体間で開花スケジュールに差は見られなかったが、雄花および球果量は高標高由来個体で有意に多く、樹高およびDBHの成長量は低標高由来個体が有意に大きかった（図4）。

以上のことから、高標高のゲノムをより多く有する個体は資源を栄養器官よりも繁殖器官へ分配する戦略をとり、それが次世代に遺伝する獲得形質であることを示唆した。このことから、両親の遺伝的背景が後代の繁殖と成長に及ぼす影響が示された。

(A)



(B)



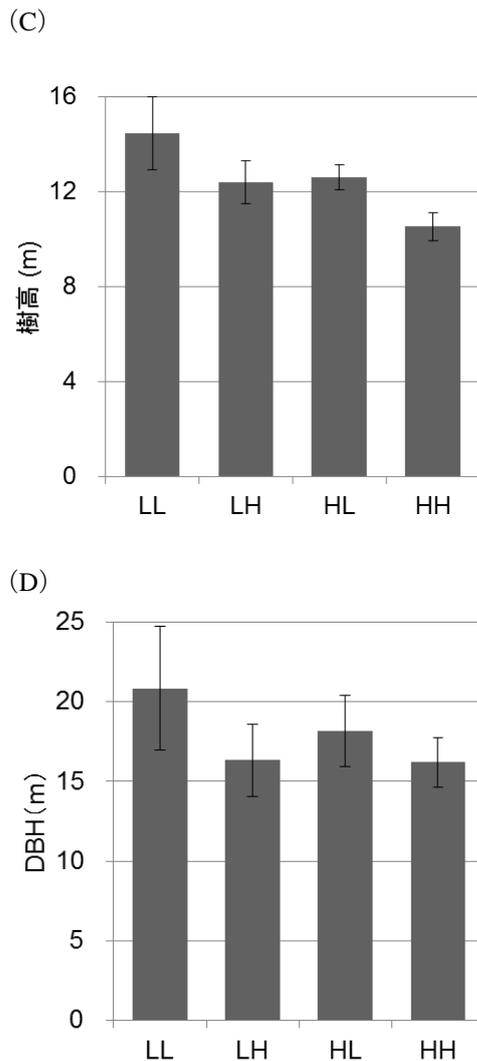


図4. 4つの交雑タイプのF1個体における球果数(A)、雄花着花割合(B)、樹高(C)、DBH(D). 交雑タイプ, LL:低×低, LH:低×高, HL:高×低, HH:高×高

一方、トドマツの葉は固く夾雑物が多く含まれており、市販のRNA抽出キットを用いた一般的な方法では安定して十分量のRNAを得ることができず、花成遺伝子の定量分析ができなかった。そのため、RNAを季節に寄らず安定的に抽出する方法を確立するという重要な課題が残った。

2011年はトドマツの豊作年であったため、高標高×低標高のF1個体(個体No.226とNo.336)を対象に、高所作業車を用いて人工交配を行い、F2種子を得ることができた(図5)。これらは標高適応の遺伝的メカニズムを解明していく上で今後、貴重な材料となると考えられる。



図5. トドマツF1個体に人工交配用の袋をかけた様子

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計5件)

- ① Ishizuka, W., Goto, S., Modeling intraspecific adaptation of *Abies sachalinensis* to local altitude and responses to global warming, based on a 36-year reciprocal transplant experiment, *Evolutionary Applications*, 査読有, 2012, 229-244
- ② Owari, T., Relationships between the abundance of *Abies sachalinensis* juveniles and site conditions in selection forests of Central Hokkaido, Japan, *Forest Resource Management and Mathematical Modeling*, 査読有, 12, 2013, 1-20
- ③ Owari, T., Forest inventory and analyses to sustain provisioning ecosystem services: experiences from the University of Tokyo Hokkaido Forest, *Proceedings of the International Symposium on a New Era of Forest Management for Ecosystem Services*, 2012, 3-5
- ④ Owari, T., Effects of overstory conditions and topographic gradients on the regeneration abundance of major tree species in a conifer-broadleaved mixed selection forest in central Hokkaido, Japan, *Programme and Abstracts of the 8th International Conference on Uneven-aged Silviculture: Optimising timber production, ecosystem services and resilience to climate change*, 2012, 36-37
- ⑤ Uchiyama, K., Fujii, S., Ishizuka, W., Goto, S., Tsumura, Y., Development of 32 EST-SSR markers for *Abies firma* (Pinaceae) and their transferability to related species.

[学会発表] (計 8 件)

- ① 尾張 敏章・後藤 晋・犬飼 浩・小池 征寛・中川雄治: 東京大学北海道演習林における主要針葉樹 3 種 (トドマツ, エゾマツ, アカエゾマツ) の分布. 2011, 3/27, 第 122 回日本森林学会大会, 静岡大学
- ② 秋元 真也・寺田 珠実・鴨田 重裕・後藤晋: トウヒ属樹木由来 PAL 遺伝子の解析, 2012, 8/4, 第 30 回日本植物細胞分子生物学会(生駒)大会・シンポジウム, 奈良県
- ③ 尾張 敏章・中川 雄治・遠國 正樹・後藤晋: 東京大学北海道演習林における主要針葉樹 3 種の分布, 2012, 3/27, 第 123 回日本森林学会大会, 宇都宮大学
- ④ 石塚 航・後藤 晋: トドマツ標高別集団の局所適応—長期の相互移植試験による実証とその応用, 2012, 3/19, 第 59 回日本生態学会大津大会, 龍谷大学瀬田キャンパス
- ⑤ Owari, T., Forest inventory and analyses to sustain provisioning ecosystem services: experiences from the University of Tokyo Hokkaido Forest, International Symposium on a New Era of Forest Management for Ecosystem Services, 28 Jun. 2012, Seoul National University, Republic of Korea
- ⑥ Owari, T., Effects of overstory conditions and topographic gradients on the regeneration abundance of major tree species in a conifer-broadleaved mixed selection forest in central Hokkaido, Japan, The 8th International Conference on Uneven-aged Silviculture, 13 Nov. 2012, Lincoln University, New Zealand
- ⑦ Hisamoto, Y., Ishizuka, W., Goto, S., Effects of altitude on the reproduction and growth of F1 progeny of *Abies sachalinensis*. 2012, 9/27, the 5th Symposium of Asian University Forest Consortium. Yamanakako-mura, Yamanashi,
- ⑧ 石塚 航・後藤 晋: 標高に沿った適応形質の遺伝様式を探る—遺伝的背景の異なるトドマツ F2 個体群を用いて, 2013, 3/27, 第 124 回日本森林学会大会, 岩手大学

[図書] (計 2 件)

- ① 松井 哲哉, 北村 系子, 志知 幸治, 第 2 章 森林の分布と気候変動森林生態学 (シリーズ 現代の生態学 8): 21-37, 2011, ISBN978-4-320-05736-4 日本生態学会編 (担当編集: 正木 隆・相場 慎一郎)
- ② 島谷 健一郎 (著): 後藤 晋分担執筆, フィールドデータによる統計モデリングと AIC: 「コラム 5 樹木の花粉の動きを統計モデルで知る」, 2012, 近代科学社, p160-164

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

後藤 晋 (GOTO SUSUMU)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授

研究者番号: 60323474

(2)研究分担者

北村 系子 (KITAMURA KEIKO)

独立行政法人森林総合研究所・北海道支所・森林育成グループ・主任研究員

研究者番号: 00343814

尾張 敏章 (OWARI TOSHIAKI)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授

研究者番号: 00292003

鴨田 重裕 (KAMODA SHIGEHIRO)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授

研究者番号: 80282565

寺田 珠美 (TERADA TAMAMI)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教

研究者番号: 70201647

久本 洋子 (HISAMOTO YOKO)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教

研究者番号: 60586014