

平成22年 5月27日現在

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19380089

研究課題名 (和文) ミズナラのフェノロジーに関与する遺伝子の適応的変異の探索

研究課題名 (英文) Search for adaptive changes in genes affecting phenology of the Japanese oak

研究代表者

原田 光 (HARADA KO)

愛媛大学・農学部・教授

研究者番号：40150396

研究成果の概要 (和文)：日本列島に広く分布するミズナラ (*Quercus mongolica* var. *crispula*) は北と南で異なる適応を受けてきたことが示唆されている。本研究ではフェノロジーに関連する遺伝子について適応的な変異を検出するためにフィトクローム遺伝子をクローニングし、集団遺伝学的解析を行うと共に、日本各地から採集した種子を北 (札幌) と南 (愛媛) で植栽しフェノロジーの違いを明らかにすることを試みた。その結果ミズナラでは3つのフィトクローム遺伝子が存在し、北での変異が南より大きいことを明らかにした。またフェノロジーに関しては初期死亡率と二次フラッシュ率に南北集団の差が見られた。

研究成果の概要 (英文)：It has been suggested that Japanese oak (*Quercus mongolica* var. *crispula*) in the northern and the southern part of Japan had experienced a different history of adaptation during the glacial age migrations and settlements. In order to detect adaptive changes in genes we cloned phytochrome genes in the oak as one of the candidates. We also collected seeds from the northern and the southern parts of Japan and planted in the experimental forest in Sapporo and Ehime to measure phenological traits. We found three phytochrome genes, and also that nucleotide diversity was high in the northern populations. In the field experiment, we observed that there are considerable difference in early death rates and secondary flash rates in the northern and the southern populations.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	7,900,000	2,370,000	10,270,000
2008年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2009年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
年度			
年度			
総計	15,200,000	4,560,000	19,760,000

研究分野：集団遺伝学

科研費の分科・細目：林学・森林工学

キーワード：ミズナラ、フェノロジー、フィトクローム、環境適応、遺伝子マーカー

1. 研究開始当初の背景

ミズナラ (*Quercus mongolica* var. *crispula*) は落葉性ナラ類としてコナラ、ナラガシワ、カ

シワなどととも、日本列島に広く分布する。これまでに日本各地の集団、ロシア (樺太、沿海州)、中国 (ハルビン、遼寧省) および

韓国からサンプルを採集し、葉緑体の非コード領域の塩基配列の変異に基づくハプロタイプの分析から、日本の落葉性ナラ類が何度かの氷河期を経て北（サハリン）と南（朝鮮半島）異なる2つのルートを通して日本に移住定着してきたことを示した。また北から移住した集団と、南から移住してきた集団は気候や日照に対する異なる適応過程を経て来たことが考えられる。このことを明らかにするためにメチオニンシンターゼとその他のいくつかの核遺伝子についてDNAレベルで自然選択の有無を検討した。その結果、中央日本で南北集団が重なり合ったために出来たと考えられる有意な連鎖不平衡を検出した。

メチオニンシンターゼについての研究結果はこのような方法論によって適応的な変異の検出が可能であることを示し、花粉による遺伝子の拡散過程をある程度明らかにしているが、適応的な遺伝子の探索には、気候変動により直接的に関わる遺伝子を標的とすることが必要である。樹木が冬の低温に耐えて越冬するためには冬芽の形成、落葉、休眠など一連の生理的な反応が必要であり、春の開芽期には休眠打破、耐凍性の低下などの現象が先行して成長が開始される。このような生理反応のきっかけとして、光条件が大きな役割を果たしており、そこでは光受容体、フィトクロームが主要な役割を担うことが知られている。そこで本研究ではフィトクロームをはじめ、フェノロジーに関与する遺伝子についてDNAレベルでの適応的な変異の検出を試みると共に、南と北の集団でどのようなフェノロジーの違いが表出されているのかを種子産地の入れ替え実験によって明らかにし、それに関与した遺伝子を見つけ出すことを試みることにした。

2. 研究の目的

(1) 日本列島の南北の集団から種子サンプルを採集し、産地を入れ替えて栽培し、北方集団と南方集団のフェノロジーの違いを明らかにする。

(2) フェノロジーに関連する遺伝子、特にフィトクローム遺伝子に注目し、ミズナラでクローニングし、構造を決定する。

(3) フィトクローム遺伝子を始めとするフェノロジーに関連する遺伝子の変異を南北集団で比較し、適応的な変異を検出する。

3. 研究の方法

(1) フェノロジーの観察・計測

ミズナラ種子は、北海道大学雨龍研究林(12個体:以下同様)と苫小牧研究林(15)、森林総研北海道支所羊ヶ丘実験林(15)、東北大学川渡農場演習林(30)、愛媛大学米野々演習林(25)から2007年秋に採取された。愛媛大学農学部温室で育成した1年生稚樹を、北海道大学

北方生物圏フィールド科学センター実験苗畑(A,B,C地区へほぼ等分)へ植え付けた。調査は枯死率と葉のフェノロジーを観察した。また、虫害への耐性評価は、北海道産(長沼産30個体)を森林総研北海道支所の人工気象室内にて高CO₂環境(720ppm)と高窒素負荷条件で調べた。

(2) フィトクローム遺伝子のクローニング

①DNAの抽出

ミズナラの葉からCTAB法を用いて、DNAを抽出した。

② Degenerate PCR

シロイヌナズナではフィトクローム遺伝子として、*PhyA*から*PhyE*までの5つの遺伝子が単離されており、このうち*PhyA/C*および*PhyB/D/E*は重複によって派生したことが系統樹から明らかにされている(Sharrock and Quail 1989, *Genes Dev.* 3: 1745-1757)。一方、ポプラでは1個の*PhyA*と2個の*PhyB*遺伝子が単離されている(Howe et al. 1998, *Mol. Biol. Evol.* 15: 160-175)。これらの情報をもとにDegenerate PCRによるフィトクローム遺伝子領域の増幅を行った。本研究ではフィトクローム遺伝子の第1エキソン領域にPCRプライマーを設定した。

③ サブクローニング

増幅産物は複数の分子種を含んでいると考えられるので、TAクローニング法によりサブクローニングを行った。サブクローニングはWizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega)を用いて増幅産物を切り出したゲルからDNAを精製した後、pGEM-T Easy Vector System II (Promega)のプロトコールに従って行った。

④ 塩基配列の決定

選択された形質転換コロニーについて、フィトクローム遺伝子のインサートをPCR増幅の有無により確認し、これらからアルカリリシス法によってプラスミドDNAを単離・精製した。これを鋳型として、BigDye terminator v1.1 Cycle sequencing kit (Applied Biosystems)を用いたサイクルシーケンシング法により塩基配列を決定した。シーケンシングプライマーとしてpGEM-T Easy VectorのT7およびSP6を用いた。シーケンサーはABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)を使用した。

⑤ 相同性検索

得られたクローンについてDDBJ データベースに依拠したBLAST検索を行い高い相同性を示すクローンを取り出した。

⑥ Inverse PCR

サブクローニングによって得られたフィトクローム遺伝子の部分配列を元に、Inverse PCR (Ochman et al. *Genetics* 120: 621-623, 1988)を行い、遺伝子全長の配列決定を試みた。

(3) フィトクローム遺伝子の分子集団遺伝学的解析

北方（稚内）および南方（稚葉）集団のそれぞれから2個体のサンプルを選び、DNAを抽出し、各フィトクローム遺伝子領域を増幅し、分子集団遺伝学的解析を行った。

4. 研究成果

(1) 植栽実験とフェノロジー観察

産地別の生存率は、北海道の3個体群では80%近くで産地間差がなかった。しかし、積雪の少ない苫小牧の個体群では試験地間の差が大きかった。一方、川渡と米野々では約60%で北海道産に比べると生存率が低かった（図1）。

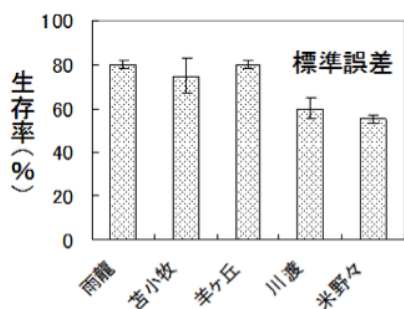


図1. 産地別生存率 (札幌)

二次フラッシュは、北海道の個体では約10%であり、これに対し、川渡では20%、米野々では40%であった（図2）。このように

北海道産と東北以南の個体では明確な差があった。北海道内での集団間差は無かった。一次フラッシュ葉が虫害(主に鱗翅目幼虫の食害)に遭うと、多くの個体で二次フラッシュが観察される。本結果は2~7日に一度虫害を避けながら観察したので、虫害を完全には防ぎ切れてはいなかったが、虫害由来と考えられるフラッシュは、かなり排除出来ている。

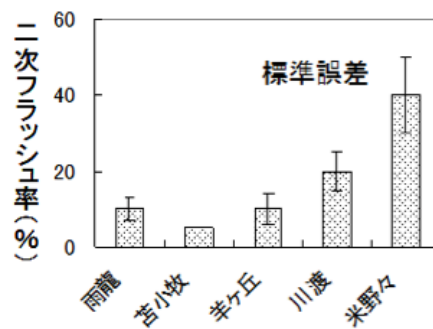


図2. 産地別二次フラッシュ率

(2) フィトクローム遺伝子のクローニング
Howe et al. (1998)、および Mathews et al. (Ann. Missouri Bot. Gard. 82: 296-321, 1995)によって報告されている Degenerate プライマーについて7つの組み合わせを試みたが、そのうち2組のプライマーでPCR産物が得られた。これらをサブクローニングし、塩基配列を決定した結果、4種の配列が得られた（表1）。

表1. Degenerate PCR によって得られたクローンとその相同配列

プライマー対	配列の長さ	相同配列	Acc No.	相同性
F933I/R1396I	437bp	<i>Populus PhyA</i>	AJ001318	88%
F933I/R1396I	410bp	<i>Quercus PhyB/D</i>	U08178	97%
OP-F/OP-R	330bp	<i>Quercus PhyB/D</i>	U08178	97%
OP-F/OP-R	297bp	<i>Quercus PhyE</i>	U08181	98%

この結果からミズナラでは *PhyA*, *PhyB/D*, および *PhyE* の3種のフィトクローム遺伝子が存在することが示唆された。それぞれをすでに全長の判明している *Populus tremula* (ポプラ) および *Ipomoea nil* (アサガオ) の *PhyA*, *PhyB/D*, および *PhyE* 遺伝子と比較したところいずれも ExonI の内部に位置することが分かった。*Alabidopsis thaliana* におけるフィトクローム遺伝子遺伝子の全長は 3700~4000bp であることから、全長の配列を決定するためにクローニングした配列を元に InversePCR を行った。その結果、*PhyA* は *P. trremula-PhyA* の 566bp から 2306bp に相当する領域、*PhyB/D* は同じく *P. trremula-PhyB2* の 220bp から 1670bp に相当する領域、*PhyE* は *I. nil-PhyE*

の 604bp から 1603bp に相当する領域の配列を決定できた。これらについて *P. trremula* もしくは *I. nil* との塩基配列の比較を行ったものを表2に示した。ミズナラの *PhyA*, *PhyB/D*, *PhyE* 間の比較では *PhyE* と *PhyB/D* 間が *PhyA* と *PhyB/D*, もしくは *PhyA* と *PhyE* 間よりも近く、同様のことはポプラでも報告されている (Howe et al., 1998)。このことはフィトクローム遺伝子が遺伝子重複によって分化し、*PhyA/C* グループと *PhyB/D/E* グループの分岐が種子植物が誕生した頃にまでさかのぼり、*PhyB* と *PhyE* の分岐が比較的最近であるとすする Alba et al. (Mol. Biol. Evol. 17: 362-373, 2000)の説を裏付けるものとなった。

表 2. フィトクローム遺伝子間の塩基置換数 (k)

<i>Q. mongolica</i>	<i>Quercus mongolica</i>		<i>Populus tremula</i>		<i>Ipomoea nil</i>
	<i>PhyB/D</i>	<i>PhyE</i>	<i>PhyA</i>	<i>PhyB2</i>	<i>PhyE</i>
<i>PhyA</i>	0.45	0.45	0.15	0.49	0.53
<i>PhyB/D</i>	-	0.35	0.51	0.26	0.40
<i>PhyE</i>	-	-	0.43	0.35	0.23

(3) フィトクローム遺伝子の分子集団遺伝学的解析

日本列島の北方(稚内)および南方(稚葉)集団のミズナラを2個体ずつ選び、そのDNAから *PhyA*, *PhyB/D*, および *PhyE* のそれぞれ 824bp, 948bp, および 783bp の配列を決定し

た。これらについて遺伝的多様性の程度を計算し、さらに Quang et al. (*Heredity* 101: 166-174, 2008)が行ったメチオニンシンターゼ遺伝子 (*Met*) の値と比較した。その結果を表 3 に示した。

表 3. 北方および南方集団におけるフィトクローム遺伝子の多様性比較

集団	遺伝子	n ¹	S ²	π ³
北方集団	<i>PhyA</i>	4	4	0.00263
	<i>PhyB/D</i>	4	4	0.00210
	<i>PhyE</i>	4	3	0.00213
	<i>Met</i> (N1)	14	29	0.00410
南方集団	<i>PhyA</i>	4	1	0.00060
	<i>PhyB/D</i>	4	0	0.00000
	<i>PhyE</i>	4	3	0.00234
	<i>Met</i> (S4)	14	26	0.00230
全体	<i>PhyA</i>	4	4	0.00134
	<i>PhyB/D</i>	4	4	0.00105
	<i>PhyE</i>	4	5	0.00283
	<i>Met</i>	120	26	0.00330

1. 配列数、2. 塩基置換数、3. 塩基多様度。

塩基多様度は *PhyA*, *PhyB/D* では北の集団が南に比べ大きかったが、*PhyE* ではほぼ等しかった。*Met* 遺伝子 (Quang et al., 2008) と比較すると全体的にフィトクローム遺伝子で多様性は低かった。また *PhyB/D* では稚内集団にアミノ酸置換を伴う変位が1箇所見つかった。北方集団で遺伝的多様性が高い傾向は Quang et al. (2008) と一致していた。

(4) 研究のインパクトと今後の展望

今後ミズナラにおけるフィトクローム遺伝子のコピー数の確定と完全長配列を決定すると共に、サンプル数を増やして塩基配列変異の詳細な集団遺伝学的解析を行うことが必要である。これによって適応的な変異を検出できる可能性がある。さらに、フェノロジーの南北集団の違いに基づいて Differential display 等の方法を用いて、違いをもたらした

遺伝子を同定してゆくことが必要になる。適応的な変異が検出できればそれをマーカーとして利用し、広葉樹林の再生や育種に広く応用してゆくことが出来る。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

- ① Quang, ND, Ikeda, S. and Harada, K. (2009) Patterns of nucleotide diversity at the methionine synthase locus in fragmented and continuous populations of a wind-pollinated tree, *Quercus mongolica* var. *crispula*. *Jour. Heredity* 100: 762-770. 査読有
- ② Kitaoka, S., Watanabe, Y. and Koike, T. (2009) The effects of cleared larch canopy and nitrogen supply on gas exchange and leaf traits in deciduous

broad-leaved tree seedlings. *Tree Physiology* 29:1503-1511. 査読有

- ③ Quang, ND, Ikeda, S. and Harada, K. (2008) Nucleotide variation in *Quercus crispula* Blume. *Heredity* 101: 166-174. 査読有
- ④ Eguchi, N., Morii, N., Ueda, T., Funada, R., Takagi, K., Hiura, T., Sasa, K. and Koike, T. (2008) Changes in petiole hydraulic structure and leaf water flow in birch and oak saplings in an enhanced CO₂ environment. *Tree Physiology* 28:287-295. 査読有
- ⑤ Watanabe, Y., Tobita, H., Kitao, M., Maruyama, Y., Choi, D.S., Sasa, K., Funada, R. and Koike, T. (2008) Effects of elevated CO₂ and nitrogen on wood structure related to water transport in seedlings of two deciduous broad-leaved tree species. *Trees - Structure and Function* 22: 403-411. 査読有
- ⑥ Okaura, T., Quang, N. D., Ubukata, M. and Harada, K. (2007) Phylogeographic structure and late Quaternary population history of the Japanese oak *Quercus mongolica* var. *crispula* and related species revealed by chloroplast DNA variation. *Genes Genetic Systems*, 82: 465-477. 査読有
- ⑦ Koike, T., Kitaoka, S., Masyagina, O.V., Watanabe, Y., Ji, D.H., Maruyama, Y. and Sasa, K. (2007) Nitrogen dynamics in leaves of deciduous broad-leaved tree seedlings grown in a unmanaged larch plantation in northern Japan. *Eurasian Journal of Forest Research* 10: 115-119. 査読有
- ⑧ Kitaoka, S., Sakata, T., Koike, T., Tobita, H., Uemura, A., Kitao, M., Maruyama, Y., Sasa, K. and Utsugi, H. (2007) Methane emission from leaves of larch, birch and oak saplings grown under elevated CO₂ in northern Japan -A preliminary study- *Journal of Agriculture Meteorology* 63: 201-206. 査読有

[学会発表] (計 3 件)

- ① 甲斐央浩・原田光 (2009) 四国におけるブナ集団の遺伝的多様性. 生物系三学会大会中国四国支部大会一般講演、高知、5月16-17日.
- ② 甲斐央浩・神岡新也・二宮生夫・原田光 (2008) 愛媛県大野ヶ原におけるブナ林の遺伝的空間構造の解析. 第 119 回日本森林学会年次大会、東京、3 月 26-29 日.
- ③ 原田光 (2007) 遺伝子から見た東アジアのナラ類の変遷と環境適応. 生物系三学会中国四国支部大会シンポジウム講演、鳥取、5 月 19-20 日.

[図書] (計 1 件)

- ① 原田光 (2007) 林木の集団遺伝学入門,

(社) 林木育種協会, 117pp.

[その他] (計 2 件)

- ① 原田光 (2009) 四国のブナ林は生き残れるか? -遺伝子多様性の観点から-. 愛媛大学農学部出張出前講座シリーズ第 6 回. 愛媛の森林(3): 22-23.
- ② <http://web.agr.ehime-u.ac.jp/~frb/frbtop.htm>.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原田 光 (HARADA KO)

愛媛大学・農学部・教授

研究者番号: 40150396

(2) 研究分担者

小池 孝良 (KOIKE TAKAYOSHI)

北海道大学・大学院農学研究院・教授

研究者番号: 10270919