

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：18001
研究種目：基盤研究(B) (一般)
研究期間：2013～2016
課題番号：25292091
研究課題名(和文) トランスクリプトームとエネルギー代謝から紐解くマングローブの生態ニッチ決定機構

研究課題名(英文) Mangrove Ecological niche

研究代表者
渡辺 信 (Watanabe, Shin)
琉球大学・熱帯生物圏研究センター・准教授

研究者番号：10396608
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の成果は以下の4点に纏められる。
(1) RNA-Seq解析により日本に分布する主要ヒルギ科マングローブであるオヒルギ、メヒルギ、ヤエヤマヒルギのトランスクリプトームデータベースを構築した。(2) ドローンを用いた空撮を実施し、日本の主要なマングローブ林の詳細な地形データ及び植生データを2.5次元のデジタルデータベース化することが出来た。(3) マングローブ林内の実生成長をモニタリングした結果、河川の上流から下流に至る微地形の変化と樹種毎の実生成長との関係が明らかになった。(4) 室内の環境制御条件下の栽培実験で、マングローブ樹種毎の生態ニッチ適応状況を説明するのに十分なデータを得ることが出来た。

研究成果の概要(英文)：The results of this research are summarized in the following points described below.

(1) We constructed a transcriptome database of three major Rhizophorae mangrove species distributed in Japan by RNA-Seq analysis. (2) We carried out aerial shoots on mangrove research area using drone and could transform the detailed topographical and vegetation data of major Japanese mangrove forest in 2.5 dimensional digital database. (3) Monitoring the seedling growth in the mangrove forest revealed the relationship between the change of configuration from the upstream to the downstream of the river and the seedling growth of each tree species. (4) We could obtain sufficient data to explain ecological niche adaptation situation of each mangrove species by indoor cultivation.

研究分野：Mangrove and Forest Science

キーワード：マングローブ 生態ニッチ

1. 研究開始当初の背景

マングローブは生物多様性の幅を広げ、その地域に住む人々に食料、建材、薪炭材等を供給するだけでなく、防風防潮林、海岸線の土砂の流失防止等、防災機能の面からも重要な役割を果たしている(Dahdouh-Guebas et al 2007:Current Biol)。しかし、スズの採掘、製炭材の乱伐、エビ養殖池等の乱開発により、この半世紀でマングローブの面積は 50%減少した(Donato et al. 2011:Nature GeoSci)。マングローブの減少によって増加した CO₂ 排出量は化石燃料の燃焼に次ぐ規模で、世界の森林伐採による増加量の 10%と推定される(Donato et al. 2011)。175

一方、マングローブは樹種毎に帯状分布することが知られており(左上の図)、この分布パターン成立の仕組みを解明することは、現存するマングローブ林を保全するためだけでなく、マングローブ林再生のためにも極めて重要である。しかしながら潮間帯に分布するマングローブは、複雑な周期で訪れる潮汐の干満(右上の図)に伴う海水に等しい高塩類濃度や湛水ストレス(右図)、樹種間の光獲得競争といった複雑な環境条件に常に曝されているため、その生態ニッチ決定機構を解明するのは容易ではない。その一因として、マングローブのユニークな生理機能とそれを担う細胞内の生体分子機構にまで踏み込んだ研究が未だ少なく、その生態的現象を生理機能面から説明仕切れていないことが挙げられる。そもそも分子生物学の基盤である機能遺伝子情報に関して、オープンリソース NCBI(The National Center for Biotechnology Information, USA)に登録されている主要マングローブ樹種の情報量は微々たるものに過ぎない(次頁の表)。しかし、ここ数年間で次世代 DNA シークエンサーが急速に普及し、RNA-seq 解析技術も格段に進歩したため、モデル生物以外の生物でも従来と比較して容易に大量の遺伝子(発現)情報を入手することが可能となりつつある。

過去に沙漠に生育する樹木の環境ストレス耐性に関して生態生理学的な研究に従事してきた申請者にとって(Watanabe et al. 2000 Plant cell, Tiss Org Cult) マングローブの環境ストレス耐性と立地環境との関係解明は興味深く、また植物のエチレン受容体の研究に従事した際(Watanabe et al. 2006 BBRC, Ishimaru et al. 2006 Plant Sci)、低酸素条件下の根系で通気組織が形成される現象に、エチレンが関与していることに強い関心を抱いた。そして申請者は平成 20~22 年度科研費基盤(C)の中で、マングローブの主要構成樹種であるオヒルギ、ヤエヤマヒルギ、メヒルギの実生の湛水ストレス耐性と生態ニッチの関係について調べ、湛水条件下では早い段階で根の通気層が形成されるが、光が不十分な状態ではヤエヤマヒルギとメヒルギの実生が早く衰弱することから、ヤエヤマヒルギとメヒルギでは実生成長の早い段階

から十分な光合成による酸素とエネルギーの供給が可能なニッチの獲得が重要であることを明らかにした(論文投稿中)。また成木においてはオヒルギ、ヤエヤマヒルギ、メヒルギの生態ニッチが湛水頻度の違いで大きく分けられるが、群落境界上では樹種毎の被陰耐性と高塩類濃度耐性能力の違いが少なからず影響することから、湛水ストレス耐性以外の視点からも生態ニッチ決定の仕組みを探求する必要があると考えた。

通常の陸生植物が生態ニッチを獲得する場合、光と水の獲得が大きな争点となる。汽水域に生育するマングローブの場合、光獲得の為に樹高成長や光合成器官増加に加え、潮汐に伴う高塩類濃度と湛水のストレスに耐えるために多大なエネルギーを消費する。結果、その消費を上回るエネルギーを供給可能な樹種だけがその場所にニッチを獲得することが出来ると考えられる。即ち、マングローブの生態ニッチ決定の仕組みを明らかにするには、構成樹種毎に個別のストレスに対する耐性の仕組みを理解するだけでは不十分であり、光合成から糖代謝に至るエネルギー代謝効率の樹種毎の違いも含めて理解する必要がある。このような広い視野に基づく解析を実現するには、従来の生理実験だけでは限界があることから、次世代 DNA シークエンサーによる大規模遺伝子発現解析が不可欠である。更にこうして得られた遺伝子発現及び生理情報を森林の成り立ちの解明にまで昇華させるためには、フィールド調査から得られる立地環境と群落レベルの光合成から得られる知見を、分子生物学、生理学、生態学から得られる知見と統合した上で、マングローブの生態ニッチ決定機構を解析する必要があると判断した。

2. 研究の目的

本研究は、世界の主要なマングローブ樹種であると同時に、日本国内にも生育するオヒルギ、ヤエヤマヒルギ、メヒルギを研究対象として、後述の3つの目標を達成することにより、マングローブの生態ニッチ決定機構解明を目的とした。

1) 次世代 DNA シークエンサーを用いて樹種毎の遺伝子発現プロファイルを作成し、データベースを構築する。2) 異なる光強度と湛水ストレス及び高塩類濃度ストレス条件下での樹種毎のエネルギー代謝の違いをトランスクリプトーム解析と各種生理実験により明らかにする。

3) 樹種毎の湛水頻度(地盤高)、塩類濃度、光条件及び土壌窒素を中心とした立地環境との関係を明らかにする。

3. 研究の方法

本研究は主に二つの活動拠点で実施した。一つは沖縄県八重山郡西表島の琉球大学熱帯生物圏研究センター西表研究施設、もう一つは愛知県岡崎市の基礎生物学研究所である。

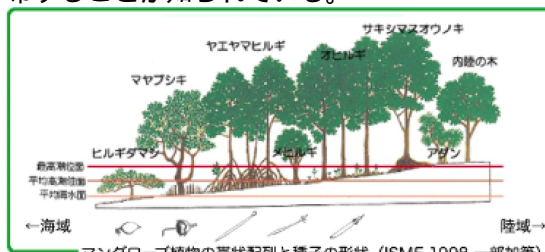
西表研究施設では各種野外調査及び長期モニタリング、化学分析、栽培実験、各種生理実験、個別の鍵酵素の遺伝子発現解析を行い、基礎生物学研究所では次世代 DNA シークエンサーによる RNA-seq とトランスクリプトーム解析を行った。西表島ではマングローブ林に調査プロットを設置し、主要マングローブ樹種の群落レベルでのデータを収集する一方、複雑なストレス環境下における個体の光合成とエネルギー代謝状況の樹種毎の違いを要素還元的に把握するために、西表研究施設で各種の栽培、実験、分析を行った。そしてトランスクリプトーム解析から得られた結果を元に、本研究のポイントとなる代謝経路に関する詳細な生理実験と分析を行った。

研究調査地

日本はマングローブ植生の分布北限にあたり、沖縄県を中心に 8 種類のマングローブが分布している。西表島は、沖縄本島から約 430 km 南西に位置しており、年平均気温 23.4、年間降水量 2,342 mm (1971-2000 年の平均) の温暖な亜熱帯海洋性気候下にある。日本のマングローブの 70% は西表島に分布し、日本で確認される全てのマングローブ樹種が生育していることから、西表島は日本国内でマングローブを研究するのに最適の環境といえる。本研究では西表島西側を流れる仲良川で立地環境データの収集と長期モニタリング、各種野外調査を行った。そして全ての実験・分析用試料を西表島で採取した。

研究材料

世界的にも代表的なマングローブで、沖縄県八重山郡西表島に生育するオヒルギ (*Bruguiera gymnorhiza*)、ヤエヤマヒルギ (*Rhizophora stylosa*)、メヒルギ (*Kandelia ovobata*)、ヒルギダマシ (*Avicennia marina*) を本課題の研究対象とした。これらのマングローブは、陸域から汽水域にかけて帯状に分布することが知られている。



野外調査：河川沿いの湛水頻度が異なる立地に生育するマングローブ林分を選定、5m x 5m の調査プロットを 24 カ所設置し、地盤高、樹木位置、樹種名、樹冠投影情報、樹高、胸高直径、積算光量、光質、葉面積指数 (LAI: Li-Cor LAI-2000 を使用) 窒素化合物を中心とした土壌調査を行った。導電率、水位、温度センサーを河川に設置し、潮位変動の長期観測を行う。フィールドに固定した防水デジタルカメラでインターバル撮影を行い、マングローブ林が潮汐により湛水する状況を画像データとして取得し、樹種群落毎の湛水頻度を計算した。必要に応じて遺伝子発

現解析、各種生理実験用の試料を採取した。

ドローンによる地形及び植生データ収集調査対象に設定したマングローブ林全域の地形及び植生の概要を把握するため、ドローンによる空撮を行った。ドローンで調査地上空 150m を時速 30km で飛行、2 秒間隔で自動撮影を行い、1000 枚程度の RAW 画像データを取得した。三次元形状を仮想空間に復元する Structure from Motion (SfM) アルゴリズムを用いて、収集した LAW 画像データ 1 枚毎に 40000 点のポイントクラウド (点群データ) 抽出を行い、上記三つの用途毎に全ての画像をアッセンブルした。三次元モデルとオルソ画像を生成し、調査地全体の微地形と植生分布の概要を把握した。

栽培実験：春から夏の間研究対象である 4 種のマングローブ樹木の胎生種子をフィールドで採取した。マングローブ実生を人工灯下で水耕栽培を行った。湛水ストレス実験は 2 段階の水位で行い、高塩類濃度ストレス実験では異なる希釈率の海水と NaCl 添加水を使用した。光条件を検討する際は光量を調整したグロースチャンバーを使用した。成長段階毎の実生の成長を記録し、葉と根を遺伝子発現解析、エネルギー充填効率測定に用いた。エネルギー充填効率は、ATP、ADP、AMP を抽出後、高速液体クロマトグラフィーを用いて計測した。

次世代 DNA シークエンサーによる RNA-seq、プロファイリング、トランスクリプトーム解析：樹種毎に乾燥、湛水、高塩類濃度、高温 (40)、低温 (10)、強光、弱光条件で栽培した植物体から葉と根を採取し、通常栽培の植物から採取した花、蕾、葉、茎、根を加え、プロファイル作成用試料とする。機能遺伝子プロファイルを作成するために、次世代 DNA シークエンサー、Illumina HiSeq2000 で RNA-seq を行った。得られたコンティグの相同性をオープンソースで検索、アノテーション付けし、マングローブ樹種毎の機能遺伝子プロファイリングを行った。

4. 研究成果

(1) RNA-Seq 解析により日本に分布する主要ヒルギ科マングローブのトランスクリプトームデータベースを構築した。植物のオソログを 8 割程度含んでいることからアセンブル結果も良好で、現在アミノ酸配列へのアノテーション付けを進めている。オヒルギ、メヒルギ、ヤエヤマヒルギのほぼ全ての部位を含むトランスクリプトーム情報を網羅しており、成果を国際学術誌に発表後に公表する。トランスクリプトーム全体のクラスタリングを行ったところ、水に冠水している場合としていない場合で発現傾向が大きく別れた。その他の環境因子に対する発現解析を現在進めている。

(2) ドローンによるマングローブ林全体の地形及び植生情報の 2.5 次元データ化を実施した。本研究の調査地以外にも主要なマング

ローブ生育地である船浦湾、仲間川の空撮を実施しており、日本の主要なマングローブ林の詳細な地形データ及び植生データをデジタルデータベース化することが出来た。今後は更に詳細な情報を得られるLiDARによるフライト調査を実施し、得られた情報は西表の自然遺産登録に関わる諸機関と共有する予定である。

(3) 4年間に渡りマングローブ林内の実生成長をモニタリングした結果、河川流域の上流から下流に至る微地形の変化と樹種毎の実生成長との関係が明らかになった。林内の暗い環境では耐陰性が高い樹種が有利となるが、明るい環境では湛水耐性と耐塩性に対する強度が影響する。それぞれの異なる環境における実生の葉の中でどのような遺伝子が働いているかを明らかにするために、水位、光、塩分濃度のモニタリングデータと合わせ、現在トランスクリプトーム解析を進めている。

(4) 野外調査地で確認した現象は様々な環境因子の変化に晒されているため、多かれ少なかれノイズを含む。そこで室内の環境が制御された条件下で、600本以上の胎生種子を用いて行った栽培実験を実施したところ、マングローブ胎生種子の発根に関する興味深い事実を明らかにすることが出来た。これらの栽培実験の結果は、マングローブ樹種毎の生態ニッチ適応状況と合致することから、全ての情報を取りまとめた後に注目度の高い国際学術誌に発表する予定である。

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 0件)

〔学会発表〕(計 4件)

Shin Watanabe (2015) 52nd annual meeting of the association for tropical biology and conservation “How to monitor damaged or rehabilitated mangrove forests” (Honolulu, Hawaii, USA: 16th of July 2015, 国際学会)

Shin Watanabe (2015) International Conference on HEART OF BORNEO, Malaysia “Preliminary survey to set up long-term mangrove monitoring site and to establish a transcriptome database for primary mangrove species” (Kotakinabalu, Sabah, Malaysia: 12th of Nov 2015, 国際シンポジウム・招待講演)

Shin Watanabe (2016) 53th annual meeting of the association for tropical biology and conservation “Rehabilitation of Mangrove Ecosystem” (Montpellier, France: 22th of June 2016, 国際学会)

Shin Watanabe (2017) The Leading Graduate Program, The 5th International

Symposium on Primatology and Wildlife “Do you want Bird’s eye?” (Kyoto University, Oiwake-Cho, Kitashirakawa, Sakyo-Ku, Kyoto-City, Kkyoto-Fu, Japan: 3rd March 2017, 国際シンポジウム・招待講演)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡辺 信 (WATANABE, Shin)
琉球大学・熱帯生物圏研究センター
准教授
西表研究施設
研究者番号：10396608

(2) 研究分担者

井上 智美 (INOUE, Tomomi)
独立行政法人国立環境研究所
生物・生態系環境研究センター
主任研究員
研究者番号：80435578

(3) 研究分担者

光田 展隆 (MITSUDA, Nobutaka)
独立行政法人産業技術総合研究所
生物プロセス研究部門
主任研究員
研究者番号：80450667

(4) 研究分担者

門田 幸二 (KADOTA, Kouji)
東京大学・農学生命科学研究科

特任准教授
研究者番号： 60392221

(4)連携研究者

重信 秀治 (SHIGENOBU, Syuhji)
基礎生物学研究所・生物機能解析センター
特任准教授
研究者番号： 30399555