

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：11101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14935

研究課題名(和文) ブナ実生個体群を用いたストレス実験による乾燥適応性遺伝子の機能評価

研究課題名(英文) Functional evaluation of the genes acting for drought adaptation by using beech seedlings

研究代表者

赤田 辰治 (AKADA, Shinji)

弘前大学・農学生命科学部・准教授

研究者番号：10250630

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではブナにおける乾燥応答遺伝子FcMYB1603と傷害誘導性遺伝子FcMYB3202の解析を行った。FcMYB3202は傷害誘導されるが、摘葉後の腋芽から展開した葉においても発現量が増大することから、エピジェネティックな調節が想定された。実際に全摘葉処理後の展開葉において5'隣接領域のメチル化が高まることが判明した。一方、FcMYB3202の塩基多様度解析ではコード領域の全置換サイトにおける非同義置換サイトの割合が、日本海側集団(JS)では0.297であるのに対し太平洋側集団(P0)では0.243、FcMYB1603に関してはJSで0.367とさらに高くP0では0.239であった。

研究成果の概要(英文)：We focused on functional and structural analysis of two members of the beech R2R3-MYB family. FcMYB1603 shows quick induction at exposure to a drought stress and FcMYB3202 is considered to function in regulation of tannin biosynthesis. Expression of FcMYB3202 was induced in the leaves after wounding, and it was also higher in the newly expanding leaves from the axil buds of the wound leaves, suggesting that FcMYB3202 could be epigenetically regulated. Indeed, the methylation status of the promoter DNA was found higher in the second leaves after wounding. We also investigated the geographic variation in nucleotide sequence of FcMYB3202 and FcMYB1603. The variety index of non-synonymous sites per total substitution (NS/total) of the FcMYB3202 in population was higher on the side of Japan Sea (JS) (0.297) than that of Pacific Ocean (P0) (0.243). With regards to FcMYB1603, it was even higher on JS (0.367) than on P0 (0.239).

研究分野：植物分子生物学

キーワード：環境適応性遺伝子 乾燥応答性 R2R3 MYB Beech ブナ

1. 研究開始当初の背景

全国のブナ集団には自然選択に中立的な遺伝的変異ばかりでなく、葉面積や堅果サイズなどの適応的形質（つまり、実際に自然選択に対して有利に働いてきた遺伝的形質）の地理的変異も報告されている。しかしながら、将来の環境変化による自然選択に対して適応的形質を創出可能であるような「潜在的な環境適応性遺伝子」の地理的変異やその分布についての詳細な研究例は少ない。一方、シロイヌナズナなどのモデル植物においては環境ストレスに対する応答機構や適応的形質に関する遺伝子情報が蓄積しており、これらの情報を利用してブナのコモログを探索しその機能を推定することが可能である。申請者らはブナ *R2R3-MYB* ファミリーに属する 86 個の遺伝子群の中から、乾燥応答、低温応答、種皮着色などに関与する遺伝子 (*FcMYB1603*、*FcMYB3201*、*FcMYB3504*) を同定しその機能解析を進めてきた。中でも、ブナ実生における強い乾燥応答性を示す *FcMYB1603* をシロイヌナズナに遺伝子導入したところ乾燥条件下における速やかな成長遅延と強いストレス耐性を示した。また、その塩基配列には日本各地のブナ 256 個体中に 26 種類の対立遺伝子が同定され、Tajima's D の中立性解析により、地域によって異なる選択（南方集団では乾燥適応性の弱い遺伝子を排除する純化選択、北方集団では異なる立地条件に即して多様な遺伝子を積極的に維持する平衡選択）を受けている可能性が示唆された（2015 年、第 126 回日本森林学会）。

2. 研究の目的

(1) シロイヌナズナやポプラなどのモデル植物を用いた遺伝子導入実験によって、南限のブナ集団で優先的なハプロタイプ (hap_1,24,25) と北方集団に多いハプロタイプ (hap_2,5,6) の機能を比べ、地域的な環境適応との関連性を推測する。

(2) モデル植物の遺伝子導入個体における乾燥応答遺伝子の発現変動を網羅的に解析し、*FcMYB1603* の転写調節因子としての役割と遺伝子型による機能的変異を明らかにする。

(3) 高標高と低標高生育限界、並びに日本海側と太平洋側のブナ林から採取したブナの堅果を用いてブナ実生バンクを作成し、乾燥ストレス下における生長量や適応形質の地理的変異と同一集団内における個体変異を調べる。そして、上記のハプロタイプとの相関関係を解析することによって、*FcMYB1603* の環境適応への貢献度を推定する。

3. 研究の方法

南限のブナ集団で優先的な遺伝子型 (hap_1,24,25) と北方集団に多い遺伝子

型 (hap_2,5,6) の機能を比べるため、それぞれの対立遺伝子をシロイヌナズナ及びポプラに導入し、乾燥耐性・適応性に関わる形態的、形質的指標を調べる。また、遺伝子導入個体における関連遺伝子群の発現変動を網羅的に解析し、*FcMYB1603* の転写調節因子としての役割と遺伝子型による機能的変異を明らかにする。一方、高標高と低標高における生育限界、並びに日本海側と太平洋側のブナ林由来のブナ実生バンクを作成し、乾燥耐性の地域間差と個体変異を調べる。また同じ個体群における、*FcMYB1603* の遺伝子型による乾燥適応性の違いを調べ、乾燥耐性の地域間差と個体変異における *FcMYB1603* の役割を検証する。

4. 研究成果

(1) ブナ乾燥応答性遺伝子 *FcMYB1603* の機能的解析

日本各地のブナ林成立において、どのような遺伝子が地域的な環境適応に働いて来たかを明らかにするため、その候補として挙げられる *FcMYB1603* の機能的解析を行った。*FcMYB1603* はブナ実生において 3~12 時間の乾燥処理に迅速に反応する遺伝子として同定され、シロイヌナズナ (Col 0) に遺伝子導入して強制的に働かせたところ、成長遅延や乾燥に対する過敏な反応など、ABA 反応に似た特徴を示した。また、塩基配列の多様性が極めて高く、地理的変異も大きい。そこでこの遺伝子が植物の乾燥応答においてどのような機能を担っているかを推測するため、*FcMYB1603* を導入したシロイヌナズナのトランスジェニック植物 (S400-2) を用いて、乾燥処理 (6 時間) 前後における遺伝子発現変動の網羅的解析を行った。

S400-2 では 45222 個の遺伝子プロブのうちコントロール個体 (Col-0) に比べて 5 倍以上のシグナル上昇を示したものが 242 あったのに比べ、1/5 以下に低下したものが 868 を数えた。

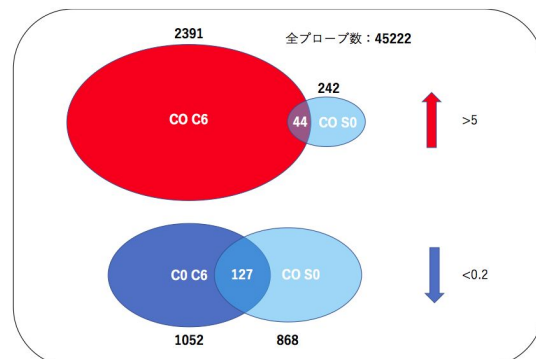


図1 コントロール個体 (Col-0) に比べて発現量が 5 倍以上に上昇/低下していた遺伝子の数

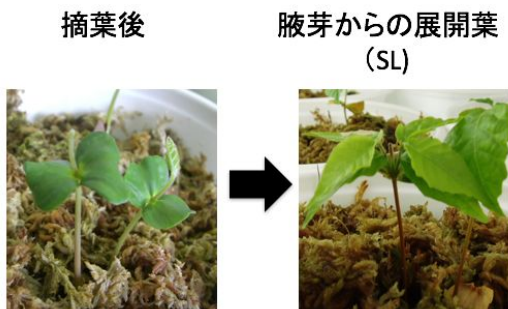
発現の低下した遺伝子の中には生体防御に関わる遺伝子やリグニン合成に関わる遺伝子などが含まれており、乾燥ストレスによるマイナス効果の顕在化に關与している可能性が考えられる。一方では ADH1 のように明らかに発現上昇しているものもあり、乾燥ストレス下での緊急対応にも働いている可能性が考えられる。今後はより詳細な検討を加え、FcMYB1603 の乾燥ストレス下における生理的役割を明らかにすることを目標とする。



図2 マイクロアレイ解析(左)と定量的RT-PCR(右)の比較解析

(2) ブナの傷害誘導性 MYB3202 プロモーターにおけるメチル化修飾

縮合タンニン(プロアントシアニジン; PA)は高等植物において最初に進化した防御物質の一つであり、広汎な植物種に存在する。食害性昆虫などによる食害や物理的損傷によって合成経路が誘導されるが、ブナにおいては前年の食害が翌年の若葉における PA 合成にまで影響を及ぼすことが報告されている。



qPCRによるFcMYB3202の発現量比較



図3 ブナの実生における摘葉処理

PA 合成の調節遺伝子としてはシロイヌナズナの種皮着色に關与する TT2 が最初に報告された。本研究グループでは、ブナの TT2 ホモログの中から、傷害誘導性を示す FcMYB3202 を同定した。FcMYB3202 は摘葉処理によって発現が誘導されるが、摘葉後の腋芽から展開した葉においても発現量の増大が觀察されることから、エピジェネティックな調節が想定される。そこで、FcMYB3202 のプロモーター領域の構造とメチル化修飾の解析を行った。

バイサルファイトシーケンス解析の結果、全摘葉処理後の展開葉では FcMYB3202 の 5' 隣接領域における C 塩基のメチル化比率が高まることが判明した。

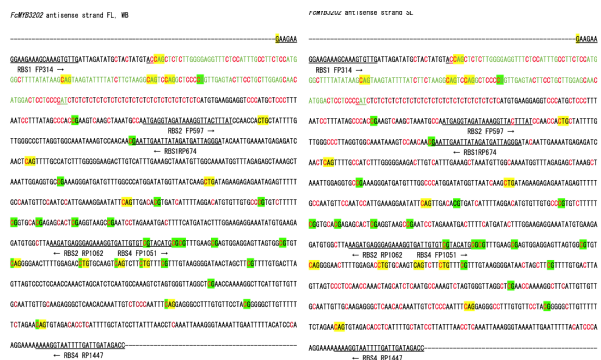


図4 バイサルファイトシーケンス解析によるメチル化シトシン配列の検出

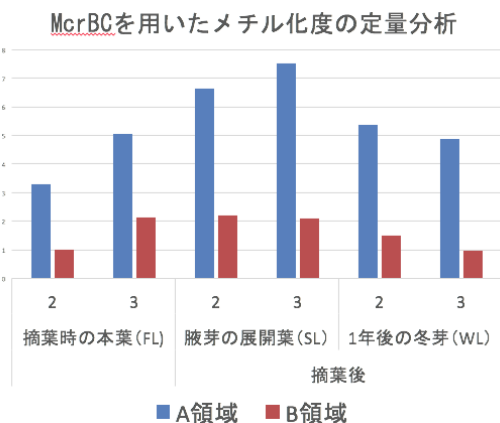


図5 MspI を用いたメチル化度の定量分析

また、MspI を用いたメチル化度の定量分析においても同様の結果が得られた。さらに、どちらの解析においても RNA ポリメラーゼの認識配列 TATA ボックス (-190 bp) の位置 近傍でのメチル化変動が大きかった。以上のことから、上記の領域には C 塩基のメチル化維持に寄与する CG 及び CHG 配列が少ないこともあり、メチル化変動が起こりやすい構造の進化がうかがえる。

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 1 件)

1. Takeshi Torimaru, Shinji Akada, Kiyoshi Ishida, Machiko Narita & Daisuke Higaki (2018) Species habitat associations in an old-growth beech forest community organised by landslide disturbances, *Journal of Forest Research*, 23:2, 98-104

[学会発表](計 7 件)

1. 赤田辰治・福井忠樹・鳥丸猛・大宮泰徳 (2018) プナの傷害誘導性 MYB 遺伝子プロモーターのメチル化修飾. 第 129 回日本森林学会大会. 高知. 2018.3.27

2. 塚本将司・鳥丸猛・赤田辰治 (2018) プナにおける R2R3MYB 遺伝子ファミリーの塩基多型の探索. 第 129 回日本森林学会大会. 高知. 2018.3.27

3. 徳中琢・鳥丸猛・赤田辰治 (2017) ヤマモミジにおける葉の着色と *GLYCOSYL TRANSFERASE* の個体変異. 東北植物学会第 7 回岩手大会. 2017.12.9

4. 鳥丸猛・塚本将司・赤田辰治 (2017) プナ乾燥応答性遺伝子 FcMYB1603 の塩基多型の地理的変異. 第 128 回日本森林学会大会. 鹿児島. 2017.3.27

5. 赤田辰治・國嶋俊輔・鳥丸猛 (2017) プナ乾燥応答性遺伝子 FcMYB1603 の機能的解析. 第 128 回日本森林学会大会. 鹿児島. 2017.3.27

6. 福井忠樹・赤田辰治・鳥丸猛 (2017) プナのタンニン合成経路に働く傷害誘導遺伝子の解析. 第 128 回日本森林学会大会. 鹿児島. 2017.3.27

7. 徳中琢・赤田辰治・鳥丸猛 (2016) ヤマモミジの紅葉におけるアントシアニン合成遺伝子群の発現変動ならびに紅葉の色合いと生態的環境要因との相関解析. 東北植物学会第 6 回宮城大会. 2016.12.10

[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
赤田辰治 (AKADA, Shinji)
弘前大学・農学生命科学部・准教授
研究者番号: 10250630

(2)研究分担者
大宮泰徳 (OHMIYA, Yasunori)
森林総合研究所・樹木分子遺伝研究領域
・主任研究員
研究者番号: 70360469

鳥丸猛 (TORIMARU, Takeshi)
三重大学・生物資源学研究科・准教授
研究者番号: 10546427

(3)連携研究者
()

研究者番号:

(4)研究協力者
()