

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：82105

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02248

研究課題名(和文) 生体防御物質から明らかにするスギの環境適応と自然選択

研究課題名(英文) Local adaptation of *Cryptomeria japonica* as revealed by defense metabolite variation.

研究代表者

内山 憲太郎 (Uchiyama, Kentaro)

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：40501937

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：スギの産地試験地において、天然林の針葉内の生体防御物質(カロテノイド10種、テルペノイド23種)の地理的変異を調査した。カロテノイド、テルペノイドともに、いくつかの物質には明瞭な地理的構造が認められた。また、いくつかのモノテルペンの含有量は、冬期の最低気温と強い相関が認められ、スギの環境適応に寄与していることが予想された。25000座のSNPとの関連解析の結果、6種のカロテノイドと10座、15種のテルペノイドと39座の関連するSNPが検出された。SNP近傍には、光合成関連タンパクや脂質代謝関連の候補遺伝子が複数確認された。これらの遺伝子は、スギの環境適応を理解する上での重要な候補遺伝子である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今後予想されている急速な気候変動は、林業および森林生態系にとって大きな脅威である。しかし、樹木種がどの程度の環境変動を許容するかはあまりわかっていない。自ら動くことができない植物は体内で様々な防御物質を生産することで環境変動へと対抗している。これらの防御物質の理解は、樹木の環境変動への応答を理解する上で重要である。そこで本研究では、日本を代表する林業樹種であるスギにおいて、分布域全域の針葉内の各種防御物質を調査し、その地理的変異と遺伝的基盤を始めて明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The defense metabolite variation (10 carotenoids and 23 terpenoids) in natural populations of *Cryptomeria japonica* was investigated using provenance trials. Some of the metabolites both carotenoids and terpenoids showed distinct geographical patterns. For some monoterpenes, strong correlations with minimum winter temperatures were observed, suggesting that they may contribute to environmental adaptation of *Cryptomeria japonica*. Association analysis using 25000 genome wide SNPs detected 10 and 39 SNPs from 6 carotenoids and 15 terpenoids, respectively. Several photosynthesis-related proteins and candidate genes related to lipid metabolism were identified in the vicinity of the SNPs. These genes may be important candidates for understanding the local adaptation of *Cryptomeria japonica*.

研究分野：森林生態遺伝

キーワード：生体防御物質 カロテノイド テルペノイド 地理的変異 環境適応 適応変異 アソシエーション解析 局所適応

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ゲノム科学の著しい進展により、これまで全く未解明であった樹木の機能形質の遺伝的基盤の解明への道が開かれた。樹木の体内で合成される各種防御物質は古くから地理的変異の存在が指摘され、環境ストレスへの応答に極めて重要であると考えられるが、その遺伝的背景と適応の実態は未解明である。本研究では日本の最も重要な林業樹種であるスギの天然林の産地試験地を用いて、冬期の強光阻害の防御物質であるカロテノイドと、生物学的ストレスの代表的な防御物質であるテルペノイドの地理的変異を明らかにし、新型シーケンサーを用いたゲノムワイドDNA解析を通して、生体防御物質の遺伝的基盤とその適応の実態について明らかにする。針葉樹の自然集団における生体防御物質の分布を遺伝的変異から明らかにする初めての試みである。

2. 研究の目的

本研究の目的は、生体防御物質の観点から樹木種の環境適応の実態を明らかにすることである。スギは青森県の鱒ヶ沢から鹿児島県の屋久島までの広い環境幅に自然分布し、古くから針葉の形態などに地理的な変異があることが指摘されている。そこで、全国のスギ天然林を対象に、冬期の強光阻害への防御物質であるカロテノイドと、菌害や昆虫などの被食ストレスへの主要な防御物質であるテルペノイドの測定を行い、その地理的変異を明らかにする。また、ゲノム全体に高密度にDNAマーカーを設計し、測定された防御物質の質的、量的データとのゲノムワイドアソシエーション解析を行うことで、未解明な防御物質の遺伝的基盤を解明し、スギの環境適応の実態を明らかにする。

3. 研究の方法

スギの天然林を対象とした遺伝解析により、スギには4つの遺伝的グループがあることが明らかとなっている(図1)。また、これらの天然林由来の挿し木苗を同一環境に植栽した産地試験地が全国4か所に設けられている。本研究では、これらのスギの産地試験地のうち、宮城、茨城、熊本の試験地を研究に用いた。

(1) スギ針葉内のカロテノイドの地理的変異の解明

スギは冬期の低温時に受ける強光ストレスへの防御物質として、各種色素を葉内に合成することが知られている。そこで、針葉内の色素の地理的変異を明らかにするため、全国の6つの天然林(青森県鱒ヶ沢(AJG)、山形県山之内(YMN)、島根県安蔵寺(AZJ)、静岡県河津(KWZ)、和歌山県新宮(SNG)、鹿児島県屋久島(SRT、YKL))由来の苗木を分析に用いた。各試験地の5~6年生の苗木から、夏期および冬期に日当たりのよい健全な枝から針葉を採取し、高速液体クロマトグラフィー法により10種類の色素の組成と量を測定した。また、クロロフィル蛍光測定装置(Mini-PAM)を用いて、光阻害の程度も同時に測定した。

(2) スギ針葉内のテルペノイドの地理的変異の解明

葉内のテルペノイドは、様々な菌害、虫害などへの防御物質として機能していると考えられている。スギにおいては、含酸素セスキテルペン類やジテルペン炭化水素類が、交配試験を通して遺伝形質であることが報告されている。そこで、産地試験地の19集団の天然林個体を対象に、テルペン類の合成が最も活発な夏期に、日当たりのよい健全な枝から針葉を採取し、ガスクロマトグラフィー分析により、各種テルペノイドの組成と含有量を測定し、その地理的変異を明らかにした。

(3) ゲノムワイドマーカーを用いた原因遺伝子の網羅的探索

産地試験地に植栽されている全国のスギ天然林18集団、224個体を実験に供試した。ゲノム内の制限酵素断片配列を網羅的に解析する手法の一つであるddRAD-seq法および、ISSR領域の網羅的増幅法であるMIG-seq法を用いて、ゲノムワイドな一塩基多型(SNP)情報を取得した。次いで、カロテノイドおよびテルペノイドの測定結果とのゲノムワイドアソシエーション解析を行い、各成分の量および組成と関連のあるSNPを検出した。アソシエーション解析には、複数の遺伝子座の効果をモデルに組み込んだ混合線形モデルを用いた。

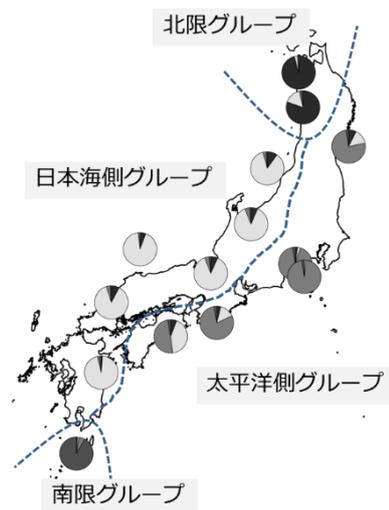


図1. 分析に用いたスギ天然林の位置と4つの遺伝的クラスタの頻度

(4) 防御物質の合成経路に関わる遺伝子の探索

スギの発現遺伝子データベースから、他の植物種で報告されているカロテノイドとテルペノイドの合成経路に関わる遺伝子の同祖遺伝子を探索し、上記解析個体の遺伝子型と各種成分間との関連解析を行った。

4. 研究成果

(1) スギ針葉内のカロテノイドの地理的変異

スギは冬期の低温下での強光阻害への防御のため、葉面に各種カロテノイドを合成することが知られている。具体的には、葉緑体に局在するキサントフィル色素が弱光下での光捕集、強光下での光の熱放出を担い、過剰な光吸収による光阻害を防ぎながら、光合成生産の低下を抑えている。一方で、低温や乾燥ストレス下で過剰な光吸収が長期間生じると、キサントフィル色素からロドキササンチンを葉面に合成し、自ら日陰を作ることで強光を防いでいる。冬期の光環境及び乾燥状態は地域により大きくことなるため、選択圧として働いている可能性が考えられる。

全国 6 集団の夏期および冬期の針葉のカロテノイドの分析の結果、いずれの集団でも冬期には葉緑素が減少し、キサントフィルサイクル色素が増加するという光ストレスへの反応が確認された。また、冬期のキサントフィル量には集団間で有意差があり、北限の集団では、他の地域よりも有意に多い傾向が認められた (図 1 (a))。冬期のロドキササンチン量も集団間で有意差が認められたが、地理的な傾向や遺伝グループとの関係は明瞭ではなかった (図 2 (b))。同一クローンならびに同一集団の試験地間での比較では、キサントフィル色素量、カロテノイド (a, b) 量ともに有意差はなく、環境が変わることによる色素合成量の可塑的な変動は比較的少ないことが示された。以上のことより、スギのカロテノイドの合成量には地域間で差があり、遺伝的支配の強い形質であることが示唆された。

一方で、同時に測定した冬期の光阻害の程度 (F_v/F_m) は、いずれの試験地においても集団間で有意な差は認められなかった。本内容は、第 132 回日本森林学会大会にて報告された。

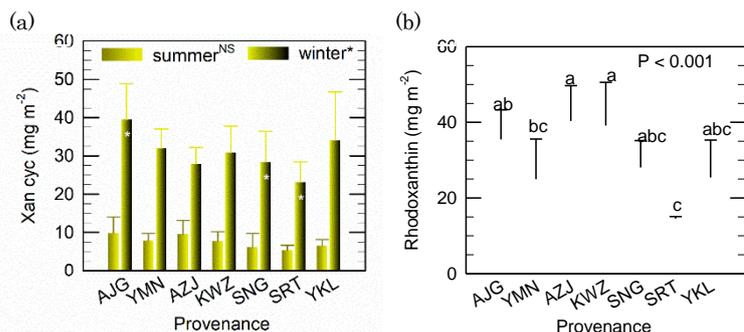


図 2. 宮城試験地における集団ごとの色素量 (a)キサントフィル量 (夏期、冬期) (b) ロドキササンチン量 (冬期)



図 3. 宮城試験地における集団ごとの冬期の針葉色

2) スギ針葉内のテルペノイドの地理的変異

針葉内のモノテルペン 10 種を定量した結果、その組成および含有量は集団間およびクローン間で大きな違いが認められた。一方で、同一クローン内の反復間では、成分の組成及び含有量ともに試験地をまたいでもほとんど違いは認められず、これらの形質は強く遺伝的に支配されていることが示された。一方で、モノテルペンの総含有量には地理的な傾向があり、北の集団ほど含有量が多い傾向が認められた (図 4 (a))。また、このうちの Sabinene については、冬期の最低気温が低い集団程含有量が多い傾向が認められた (図 4 (b))。さらに、太平洋側の一部の集団にのみ特異的に検出される成分も確認された (図 4 (c))。以上のことより、モノテルペンの組成は遺伝的形質であり、地理的な変異が存在すること、一部の成分は冬期の気温などとの関連が認められたことなどから、スギにとっての適応形質の一つである可能性が示唆された。

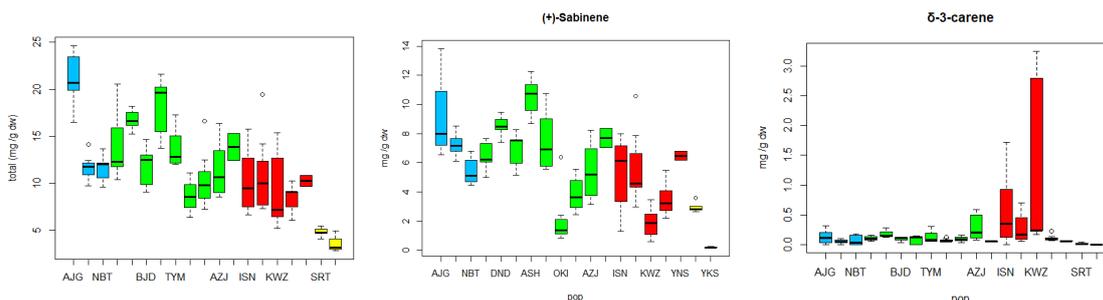


図 4. 集団ごとのテルペノイドの含有量 (a)モノテルペンの総含有量、(b) Sabinene、(c) δ -3-carene
バーの色の違いは遺伝的グループの違いを示す。水色：北限、緑：日本海、赤：太平洋、黄：南限

次いで、ジテルペン 12 種の定量の結果、Kaurene、Phyllocladene、Sclarene の 3 つの成分の含有量により、7 つのケモタイプに分類することができた (図 5)。一方でジテルペンの総含有量には地理的な傾向は認められなかった。今回の解析個体内では、太平洋側および屋久島系統では Phyllocladene タイプが欠損していた。試験地間の比較では、主要成分の増減は少ないが、一部のジテルペンは可塑的に変化しているものも認められた。以上のことより、ジテルペンの量と組成は遺伝的支配の傾向が強いが、地理的傾向はほとんどなく、自然選択を受けている可能性は低いことが予想された。本内容は第 71 回日本木材学会大会にて報告された。

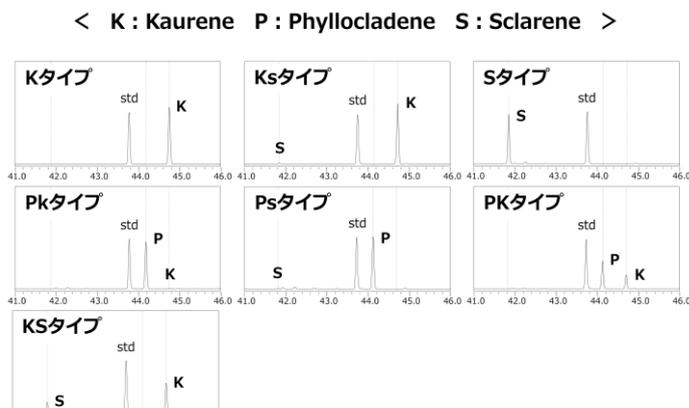


図 5. ジテルペンの 3 つの主要な成分の含有量による 7 つのケモタイプの分類

(3) ゲノムワイドマーカーを用いた原因遺伝子の網羅的探索

スギ天然林 19 集団 224 個体の ddRAD-seq 解析により、21963 座の SNP が検出された。また、同様に MIG-seq 解析からは 2043 座が検出された。得られた SNP 情報とカロテノイド 10 種とのゲノムワイド関連解析を行った結果、6 種のカロテノイドにおいて、計 10 座の有意な相関のある SNP が検出された。図 6 にロドキササンチン量との関連解析の結果を示す。検出された SNP 近傍の遺伝子を探索し、機能推定を行ったところ、葉緑体関連のタンパクや、色素合成関連の候補遺伝子が複数確認された。

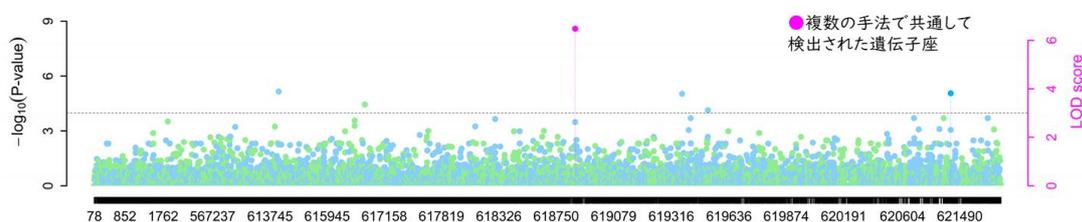


図 6. 冬期の針葉内のロドキササンチン量とのゲノムワイド関連解析

次いで、23 種のテルペノイドとの関連解析の結果、モノテルペン 9 種、ジテルペン 6 種において、計 39 座の SNP が検出された。図 7 に Sabinene 含有量との関連解析の結果を示す。一方で、ジテルペンのケモタイプの分類との関連解析では、有意な遺伝子座は検出されなかった。検出された SNP 近傍の遺伝子の機能推定の結果、脂質代謝関連の候補遺伝子が複数確認された。カロテノイドとテルペノイドは光合成産物を出発点として、その合成経路を一部共有しているが、今回の解析からはテルペノイドとカロテノイド間で共通の遺伝子座は検出されなかった。以上の遺伝解析の結果は、第 68 回日本生態学会大会にて報告された。

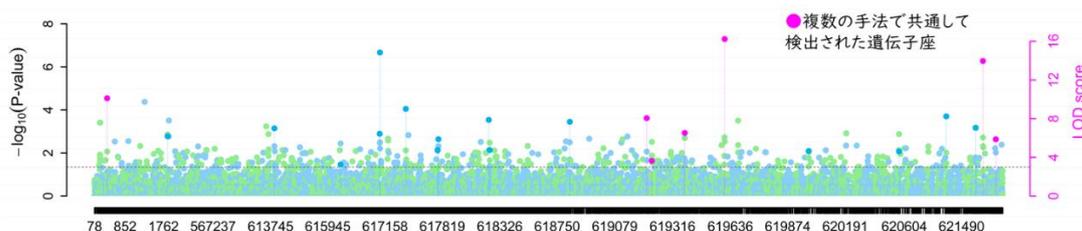


図 7. 夏期の針葉内の Sabinene 量との関連解析の結果

(4) 防御物質の合成経路に関わる遺伝子の探索

既存の植物の発現遺伝子データベース上から、キサントフィルサイクル関連 7 座、ジテルペノイド生合成関連 19 座、セスキテルペノイド生合成関連 16 座の遺伝子を抽出し、スギの発現遺伝子データベース内でホモログを探索した結果、キサントフィルで 6、テルペノイドで 6 座の候補遺伝子が検出された。これらの遺伝子内の SNP を探索し、計 63SNP をマーカー化した。成分分析に用いた個体の遺伝子型を決定した後、形質データとの関連解析を行った。しかしながら、いずれの SNP も成分量や組成との有意な相関は認められなかった。

以上を通して、スギの生体防御物質である、カロテノイドおよびテルペノイドの地理的変異が明らかとなった。どちらの物質も、環境変化による可塑性の程度は低く、遺伝形質であることが示唆された。また、キサントフィルサイクル色素量や、一部のモノテルペン量は、冬期の降水量や気温との相関が認められ、環境に対する適応に寄与している可能性がうかがえた。また、ゲノムワイドマーカーとの関連解析を通して、それらの物質の遺伝的基盤の一部を明らかにすることができた。以上により得られた情報は、スギの将来環境下での応答を理解するうえで有用であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 内山憲太郎、韓慶民、楠本倫久（森林総合研究所）、中尾勝洋（森林総合研究所関西支所）、上野真義（森林総合研究所）、津村義彦（筑波大学）
2. 発表標題 スギの遺伝的系統と局所適応
3. 学会等名 第67回日本生態学会大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 内山憲太郎、韓慶民、楠本倫久、中尾勝洋、上野真義（森林総合研究所）、津村義彦（筑波大学）
2. 発表標題 産地試験地を用いたスギの機能形質の遺伝解析
3. 学会等名 第68回日本生態学会大会（オンライン）（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 韓慶民、楠本倫久（森林総合研究所）、陶山佳久（東北大学）、金谷整一（森林総合研究所）、津村義彦（筑波大学）、内山憲太郎（森林総合研究所）
2. 発表標題 Genetic variation in photosynthetic pigments among diverse origins of <i>Cryptomeria japonica</i> grown in common gardens.
3. 学会等名 第132回日本森林学会大会（オンライン）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 楠本倫久、韓慶民、金谷整一（森林総合研究所）、陶山佳久（東北大学）、津村義彦（筑波大学）、内山憲太郎（森林総合研究所）
2. 発表標題 天然スギ針葉に含まれるテルペン類の地理的変異
3. 学会等名 第71回 日本木材学会大会（オンライン）
4. 発表年 2021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	韓 慶民 (Han Quingmin) (40391180)	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)	
研究分担者	楠本 倫久 (Kusumoto Norihisa) (80537168)	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)	
研究分担者	陶山 佳久 (Suyama Yoshihisa) (60282315)	東北大学・農学研究科・教授 (11301)	
研究分担者	金谷 整一 (Kanetani seiichi) (90353648)	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)	

	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
連携研究者	中尾 勝洋 (Nakao Katsuhiro) (30758587)	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)	
連携研究者	上野 真義 (Ueno Saneyoshi) (40414479)	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)	

6. 研究組織（つづき）

	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
連携研究者	木村 恵 (Kimura Megumi) (20436520)	国立研究開発法人森林研究・整備機構・林木育種センター・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