

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：82105

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05680

研究課題名(和文) スギはどう高温を記憶するのか—高温順化分子基盤の解明—

研究課題名(英文) How Cryptomeria japonica memorizes high temperature: Elucidation of the molecular basis of heat acclimation.

研究代表者

伊原 徳子 (Ihara, Tokuko)

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：40353594

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：トランスクリプトーム解析では、環境条件によってスギの高温順化に関わる遺伝子に違いがあることを明らかにし、それぞれの条件で重要な遺伝子を明らかにした。生理的パラメータの測定では、順化处理温度により、その後の光化学系IIが高温により受けるストレスの程度が違っていることを明らかにし、遺伝子発現データと生理的パラメータの関連から、自然光下で高温順化に重要な遺伝子群を明らかにした。高温順化関連遺伝子の調節領域のメチル化レベルの解析のため、遺伝子調節領域を増幅するプライマーを開発し、スギでのバイサルファイトシーケンス手法を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

将来の気候変動では夏季における異常高温の頻度の増加が予測されており、樹木の成長や森林生態系の維持にとって大きな問題となる。森林資源として重要な針葉樹であるスギについて、植物の高温への防御反応の一つである「高温順化」という現象の分子基盤に迫る情報が得られたことは、今後の森林の保全を考える上で重要な社会的意義がある。また、永年性であり、裸子植物であるスギで得られる情報は、学術的な意義も大きい。

研究成果の概要(英文)：Transcriptome analysis revealed that there are differences in the genes involved in high temperature acclimation of *Cryptomeria japonica* depending on the environmental conditions, and the genes that are important under each condition were identified. The measurement of physiological parameters (Fv/Fm) revealed that the degree of stress to which photosystem II is subsequently subjected to high temperature differs depending on the temperature of the acclimation treatment. The association of gene expression data with physiological parameters revealed a group of genes important for high temperature acclimation under natural light. To analyze the methylation level of regulatory regions of genes related to acclimation to high temperature, I developed primer pairs to amplify the regulatory regions of genes and established a bisulfite sequencing in *Cryptomeria japonica*.

研究分野：森林遺伝学

キーワード：高温順化 トランスクリプトーム スギ メチル化

## 様式 C-19、F-19-1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

将来の気候変動では夏季における異常高温の頻度の増加が予測されており、樹木の成長や森林生態系の維持にとって大きな問題となる。植物では高温への防御反応の一つとして、高温の経験が“記憶”され、その後の高温ストレスに対する耐性が高まる「高温順化」という現象が知られている。森林資源として重要な針葉樹にも高温順化能力があることが示されていたが、その分子的な基盤は明らかになっていなかった。

日本の代表的な針葉樹であるスギは気温への適応力が高く、北は青森から南は屋久島まで広く天然林が分布している。その背景の一つとして高温順化による高温耐性の強化が考えられる。先行研究において、あらかじめ致死的でない高温で処理(順化处理)したスギ実生と未処理の実生における遺伝子発現を比較することにより、順化处理で特定の遺伝子群の発現制御に変化が生じていることが明らかになっていた。すなわち、スギも高温を“記憶”して次の高温に備える仕組みを持っており、これらの遺伝子群はそのメカニズムに関与している可能性が高いと考えられる。

樹木の各個体は親から受け継いだ固有のゲノムDNAを持ち、それぞれの個体の性質の違いは先天的に持つ遺伝的変異(塩基配列の違い)に基づくと考えられてきた。しかし近年、後天的にゲノムDNAのメチル化やDNAの巻きつくヒストンの修飾状態が変化して遺伝子発現が変化する「エピジェネティックな遺伝子発現制御」による環境ストレス耐性の獲得機構が注目されるようになった。また、先行研究において急激な高温処理で劇的に活性化されるレトロトランスポゾンが見つかった。レトロトランスポゾンは活性化すると自身の配列を複製してゲノムDNAの別の場所に挿入する性質を持つ可動遺伝因子である。高温で活性化したレトロトランスポゾンが高温への適応に関わる遺伝子領域に挿入されれば、遺伝子の発現変化を引き起こす可能性がある。スギのような固着性で世代時間の長い樹木でも、こうした後天的なゲノムDNAの変化による遺伝子発現調節が高温順化に関わり、高温適応に影響を与えていると推測される。高温を経験させることでスギの遺伝子発現がどう変化し、ゲノムDNAにどのような変化が起き、個体の高温への耐性にどのような変化をもたらすのかを解明することが、将来的なスギや針葉樹の保全を考える上では重要である。

### 2. 研究の目的

日本に広範囲に分布するスギを用いて高温順化处理に伴う遺伝子発現及び高温耐性の変化、またそれに関連する後天的なゲノムDNAの変化を検証する。これにより高温順化や高温適応で主要な役割を担っている遺伝子を明らかにし、針葉樹の高温への適応の分子基盤を解明する。

### 3. 研究の方法

スギに高温順化处理を行った際の高温耐性の変化を数値化して捉えるために、生理学的指標としてストレスの指標である光化学系IIの最大量子収率( $F_v/F_m$ )、細胞膜変化の指標である電解質溶出量(EC)を測定した。生理学的指標の測定に用いた材料からDNAを抽出し、高温順化関連遺伝子領域のDNAメチル化をバイサルファイトシーケンス法で解析した。

また、DNAを抽出した材料から同時にRNAを抽出し、高温順化に伴う遺伝子の発現変動を明らかにするためにトランスクリプトーム解析を行った。共発現する遺伝子のモジュールをWeighted Gene Coexpression Network Analysis (WGCNA)により構築し、モジュールを要約する遺伝子発現パターンを抽出して、 $F_v/F_m$ 値との相関から、高温耐性の変化に影響する遺伝子を明らかにした。

熊本県、宮城県、茨城県の試験地に植栽された天然林地由来のスギ個体で高温順化や高温耐性の強化に寄与する遺伝子の発現を比較した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 順化处理温度による高温ストレス応答の変化

人工気象器下でスギ実生苗に 34、36、38、40°Cの高温順化处理(3時間、2 日間)を行った後、24 時間後に 45°C (3 時間)のヒートショックを与えた。順化处理からヒートショックから1週間後まで、Fv/Fm を経時的に測定した。Fv/Fm は高温の影響を受けやすい光学系 II の障害の程度を示し、健全な植物では 0.8 前後で、光学系 II が障害を受けると低下する。高温処理による Fv/Fm の低下の幅は高温順化处理を行わなかったコントロールにおいて最も大きく、最も低下の幅の小さかったのは 38°Cの順化处理個体であった。高温順化处理を行ったサンプルの Fv/Fm は高温処理 1 週間後には 0.7 以上まで回復したが、コントロールは回復しなかった(図 1)。尚、葉の細胞膜の損傷具合の指標となる電解質溶出量(EC)も測定したが、用いた条件下では高温順化处理による差を検出することはできず、スギ実生の針葉で高温ストレスの指標として用いるにはさらに実験条件の検討が必要であると考えられた。

##### (2) 人工光下における高温順化による変動遺伝子

先行研究で行った 38°Cの順化处理がヒートショック時(45°C)の遺伝子発現に与える影響を調べたトランスクリプトーム解析では、参照遺伝子配列中に多くの部分配列と思われる短い配列が含まれていた。また(3)で述べる自然光下での結果との比較を容易にするため、本研究で得られたデータと合わせて参照配列を再構築して再解析を行った。ヒートショック時の遺伝子発現を順化個体と未順化個体を比較したところ、順化個体で過酸化水素、光、熱応答遺伝子の発現が高く、未順化個体では温度応答、タンパク質折りたたみに関する遺伝子の発現が高かった。

##### (3) 自然光下の高温順化による変動遺伝子

自然光下における高温ストレス実験では、温室の温度制御の都合上、人工気象器と同じ温度条件での実験ができなかったため、一部の实生苗を 36°Cで高温順化处理した後、全個体を 38°Cで 3 時間高温処理して Fv/Fm を測定した。人工気象器下では 38°Cで Fv/Fm の低下は見られなかったのに対し、自然光下では高温順化处理をしなかった個体において著しい低下が見られ、スギ実生の高温に対する応答は気温以外の条件によっても大きく変化することがわかった(図2)。36°Cの順化处理でも Fv/Fm の低下の幅は減少し、回復も早まるなど、高温耐性を高める効果は明らかであった。しかし、人工光下で順化により発現が変動した遺伝子の挙動を解析した結果、36°Cの順化处理による差はみられず、38°C処理で強い発現が誘導されていた(図3)。この結果から、順化处理の温度によって高温順化に関与する遺伝子群には違いがあることがわかった。人工光下、自然光での結果を比較したところ、順化处理1日後に発現が高くなる遺伝子の持つ機能は共通していたが、自然光下においてヒートショック時に順化处理で発現が影響される遺伝子は光ストレス応答に関わる遺伝子を多く含むという違いがあった。人工光下と自然光下でヒートショック時に共通して順化处理個体で発現が上昇したのは 38 遺伝子、発現が低下した遺伝子は 25 遺伝子で、転写因子 7 個を含んでいた。

##### (4) 高温ストレスの低減に影響する遺伝子

スギで見られた光学系 II 障害の低減に寄与する遺伝子群を抽出するため、自然光条件下で高温順化や高温ストレス条件下で共発現する遺伝子のモジュールを構築した。各モジュールを代表する遺伝子発現パターンと比較した結果(表1)、Fv/Fm 値と光化学系 II 活性中心タンパク質の遺伝子を多く含むモジュール、オルガネラの RNA のプロセッシング関連遺伝子を多く含むモジュールの発現パターンとの間に正の相関、活性酸素代謝関連の遺伝子が多いモジュールの間に負の相関があり、これらの遺伝子が気温により転写レベルの制御を受けていることが示された。Fv/Fm と相関を示すモジュールに含まれる転写因子のうち、モジュールでの他の遺伝子との関連度から、シロイヌナズナで高温体制に必要とされる MYB5 に相同性を持つ遺伝子及び乾燥と ABA への応答に関わる Dil9-3 に相同性を持つ遺伝子の重要度が高いと考えられた。これらはスギの高温順化制御において重要な遺伝子であると推測される。

(5) 野外試験地での高温順化関連遺伝子の発現

茨城では6月に急激に気温が上昇した猛暑日に、宮城・熊本では8月の真夏日に採取したサンプルについて発現量を解析した。高温順化で重要だと考えられ、スギの制御条件下でも高温順化への関連が示唆されたシロイヌナズナの *HsfA2* 相同遺伝子が茨城での試験地で他の試験地に比較して高く発現していた。これは急激な気温上昇への応答である可能性がある。また、平均気温が最も高い熊本では10個の高温順化関連遺伝子について他の試験地より高発現している傾向が見られた。

(6) ゲノム DNA の解析

得られた結果から、スギの高温順化の分子基盤において重要な33遺伝子を選び、スギの参照ゲノム情報を用いてプロモーター領域を増幅するプライマーを開発し、レトロランスポズンの挿入の有無の検出及びバイサルファイトシーケンス法によるDNAメチル化解析を進めているが、高温順化の程度と関連するような結果は研究期間内に得られなかった。

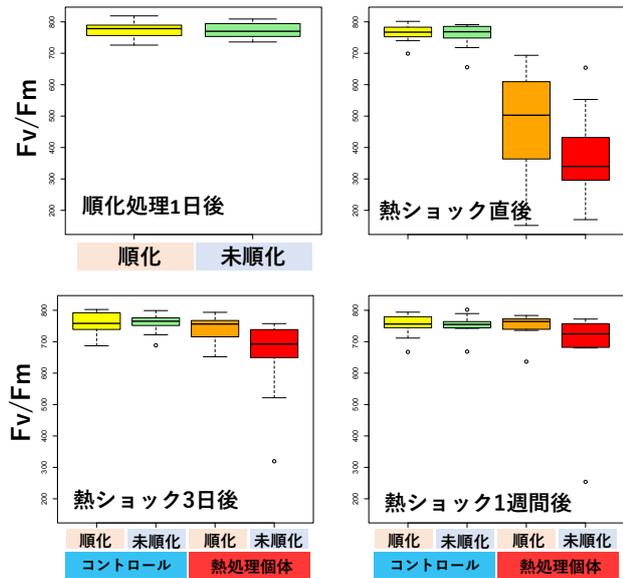
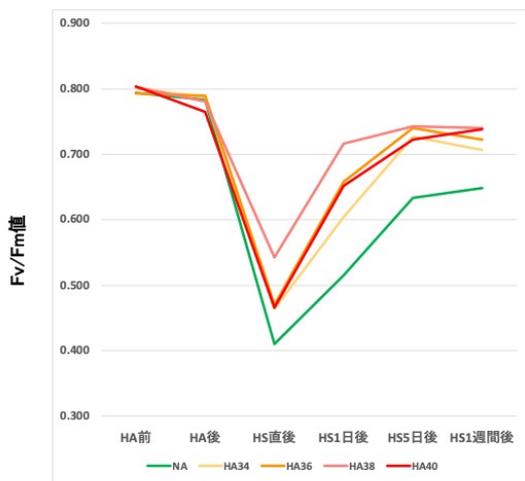


図1 高温順化処理温度による熱ショック(45°C)後のFv/Fm値推移の違い(人工光)

図2 高温順化処理(36°C)による熱ショック(38°C)後のFv/Fm値推移の違い(自然光下)

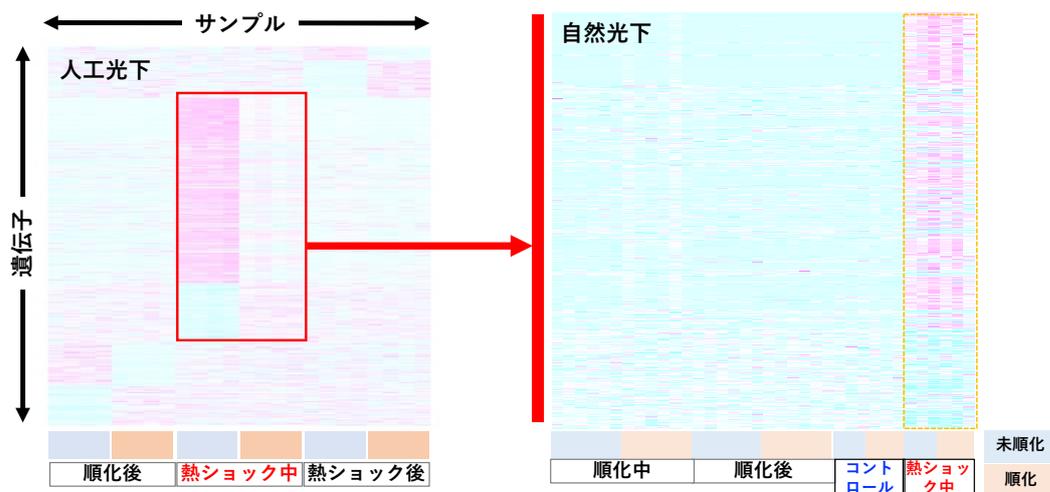


図3 人工光下で順化により発現が変動する遺伝子の自然光下での発現パターン

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tokuko Ujino-Ihara	4. 巻 97
2. 論文標題 Stress-responsive retrotransposable elements in conifers	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Genes & Genetic Systems	6. 最初と最後の頁 185-191
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1266/ggs.22-00042	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 伊原徳子
2. 発表標題 遺伝子発現から探る スギの高温順化メカニズム
3. 学会等名 日本森林学会
4. 発表年 2024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
研究協力者	内山 憲太郎 (Uchiyama Kentaro)		
研究協力者	陶山 佳久 (Suyama Yoshihisa)		
研究協力者	津村 義彦 (Tsumura Yoshihiko)		

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
---------	---------