

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月31日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22380086

研究課題名（和文） ミズナラのフェノロジーに関連づけた適応的遺伝子の網羅的探索

研究課題名（英文） Comprehensive search of adaptive genes relating to phenology in 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）：

ミズナラは日本列島に広く分布するが、北東日本と南西日本では氷河期以降の分布の拡大様式に大きな違いが見られる。分布の拡大と定着は異なる地域環境への適応によってもたらされたはずである。本研究では日本の南北の各地から種子を採集し、一カ所に植栽した材料についてフェノロジーに違いが生じるかどうかを観察し、さらにこれに違い与えたと考えられる遺伝子を適応的な遺伝子の候補として同定し、集団遺伝学的手法によって自然選択の検出を試みた。

研究成果の概要（英文）：

The Japanese oak (*Quercus crispula* Blume) broadly distributes on the Japanese archipelago and clear genetic structure, which has been derived from genetic differentiation at the glacial refugia populations, has been revealed by chloroplast DNA analysis. We examined phenological changes for the transplanted materials collected from six populations covering broad area of Japan and tested the operation of natural selection for several candidate genes by molecular population genetic methods.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	6,800,000	2,040,000	8,840,000
2011年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2012年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
年度			
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：森林学・森林科学

キーワード：ミズナラ、フェノロジー、フィトクロム、環境変動、遺伝子、適応、オゾン濃度

## 1. 研究開始当初の背景

ミズナラ (*Quercus crispula* Blume) は日本の冷温帯を代表する代表的な樹種で、ひろく日本列島全体に分布する。これまでに葉緑体

DNA の変異の解析から、日本列島のミズナラは中央構造線を境界として北と南で大きく二つのグループに区分されることが示されている (Okaura et al. 2007)。8000 年前

までの北海道や東北地方ではナラ類の花粉が見つからないことから、日本の中央部に逃避したレフジア集団から最終氷期以降分布が北方に拡大したことが推測された。一方で南方の集団は氷河期に西日本の低地に散在し、氷河期以降の温暖化に伴って高い高度に分布するようになったと考えられた。このことから南西日本と北東日本のミズナラは極めて異なる環境への適応過程を経ており、環境適応的な遺伝子では北と南で遺伝子頻度が有意に違うはずである。本研究では適応的な遺伝子の候補として特に、光環境の変動に応答することが知られているフィトクロム遺伝子について北と南で遺伝子頻度に差があるかどうかを DNA の塩基配列のレベルで解析すると共に、遺伝子発現のレベルで南北の地域差があるかどうかを調べた。

一方、現在のミズナラ集団も地球温暖化のような連続的な環境の変動にさらされている。このような環境変動が実際にどのような生理的变化をもたらすのか、ミズナラをモデルとして生理生態学的研究を行った。

## 2. 研究の目的

### (1) ミズナラの環境適応的な遺伝子の探索

ミズナラなど、日本列島に広く分布する植物集団が地域的な遺伝的分化、すなわち遺伝構造を持つ理由として、(a) 過去の氷河期に植物の集団サイズが極端に減少し、現在の集団はその起源となる逃避地集団の遺伝構造に大きく依存していること、(b) 温暖化に伴う植生分布の拡大後、地理的な障壁などにより集団が隔離されたこと、(c) 分布拡大の過程で地域環境への異なる適応が生じたことなどが考えられる。本研究では最初に、日本のミズナラ集団、特に北東日本の集団についてその起源とより詳しい遺伝構造について明らかにすることを試み、これに基づいて主にフィトクロム遺伝子を環境適応的な遺伝子の候補として分子集団遺伝学的な解析を行った。

#### ① ミズナラの集団遺伝構造の解明

これまでの研究から南西日本の集団には葉緑体のレベルで多くのハプロタイプが見つかり、複数の逃避地が最終氷期に西日本の各地に存在したことが示唆される。また祖先型

とみられるハプロタイプが朝鮮半島や中国東海岸のミズナラやモンゴリナラに見出されることから、氷河期に地続きとなった朝鮮半島から繰り返し移住が起こったと推定される。それに対して北東日本に見出されるハプロタイプは I 型と II 型のみであり、最終氷期以降、中央日本のどこかに取り残されたそれぞれの逃避地から北方に分布を拡大したことが考えられる。本研究では葉緑体 DNA の変異に基づいて、北東日本のミズナラ集団の遺伝的構造をさらに詳しく調べ、その起源を探る。

#### ② フィトクロム遺伝子の分子集団遺伝学的研究

環境適応的な遺伝子としてフィトクロム遺伝子に注目し、ミズナラでのフィトクロム遺伝子のクローニングを行い、さらに南北の集団の変異を集団遺伝学的に解析することにより自然選択の有無を検出することを試みる。

#### ③ フィトクロム遺伝子の発現解析

適応的な変異は特定の遺伝子の発現を調節している調節遺伝子にも起こることが考えられる。フィトクロムの場合光条件によってフィトクロムの発現を調節している遺伝子があると考えられるので南北の集団で異なる遺伝子発現が実際に行われているのかを明らかにする事を試みる。(以上原田)

#### (2) 連続的な環境変動の影響の生理生態学的研究

ミズナラの環境適応能力を生理生態学的手法をもちいて特定する。本研究では枯死や衰退につながる要因として、対流圏(=地表付近)オゾン濃度への応答と地域変異の可能性も合わせて調査した。さらにナラ枯れの影響も調べるために、激害地の調査から北海道へ侵入する可能性を検討する。(以上小池)

## 3. 研究の方法

### (1) ミズナラの環境適応的な遺伝子の探索

#### ① ミズナラの集団遺伝構造の解明

Okaura et al. (2007)では4つの葉緑体非コード領域、*trnT-trnL* spacer, *trnL* intron, *trnF-trnF* spacer, *atpB-rbcL* spacer *trnH-psbA* spacer および *matK* 遺伝子領域

が調べられ、16カ所の塩基置換、2カ所の挿入配列、5カ所の単一塩基の繰り返し数の変異が見つかった。これにより日本では9ハプロタイプが区別された。一方で、Kanno et al. (2004)は *trnQ-trnS* spacer 領域に1カ所の塩基置換 (T/C) を見出し、Tの変異を持つもの (T-type) が、日本全体に分布するのに対し、Cの変異を持つもの (C-type) は北東日本にしか分布しないことを報告した。Okaura et al. (2007) の結果と照らして、南西日本の T-type は様々なハプロタイプからなるが、北東日本の T-type は Okaura et al. (2007) のハプロタイプ I、C-type はハプロタイプ II に相当することが予想された。Okaura et al. (2007) によればハプロタイプ II は中央構造線から北に分布するのに対し、type I は北海道と東北地方の早池峰山のみに見られる。Kanno et al. (2004) のサンプル地点が北東日本を中心に100カ所以上で行われていることから、CおよびT-type とハプロタイプ I および II との関連づけが行われればハプロタイプ I のより詳細な分布が示されると予想された。そこで岡浦によりハプロタイプが判明している北海道5集団、東北8集団、合計91個体について *trnQ-trnS* の配列を決定した。さらに日本列島周辺の集団として、サハリン、ロシア沿海州、中国ハルビンの集団についてハプロタイプおよび T/C-type を決定した。

#### ② フィトクロム遺伝子の分子集団遺伝学的研究

ミズナラについては重複した3つのフィトクロム遺伝子 (PHYA, PHYB/D, PHYE) があることをこれまでの研究で明らかにしてきたが、本研究ではエキソン I の領域についてプライマーを作成し、北東日本8集団、南西日本8集団の合計16集団について合計127個体の配列を決定した。得られた配列について塩基多様度、ハプロタイプ多様度、および遺伝的分化の程度を調べるとともに、AMOVA を用いて集団構造解析を行った。さらに Tajima's D をはじめとする中立性の検定を行い自然選択の有無を調べた。

#### ③ フィトクロム遺伝子の発現解析

日本の南北6地域 (北海道大学雨竜演習林、羊ヶ丘、東北大学川渡演習林、愛媛大学米々

野演習林、九州大学椎葉演習林) で種子を採集し、北大農学部札幌試験地に植栽して育てた合計42の実生個体を実験に用いた。これらは3つの重複プロットを設けて植栽された。2012年9月に9時、13時、17時の3回に分けて各プロットで葉を採集した。これからRNAを抽出し、TOYOBO リバトラエース RT-PCR キットを用いて cDNA に逆転写を行った後、Qiagen Roter-Gene SYBR Green RT-PCR Master Mix を用いて転写活性を測定した。測定には Qiagen Roter-Gene Q を用いた。測定値をハウスキーピング遺伝子として His 3 の転写活性を測定し、その値で補正した活性値について統計解析を行った。

#### (2) 連続的な環境変動の影響の生理生態学的研究

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に産地間試験の要領で2反復でのミズナラ集植場を設け、その後の成長調査を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) ミズナラの適応的遺伝子の探索

##### ① ミズナラの集団遺伝構造の解明

Okaura et al. (2007) によりハプロタイプが決定されている北東日本の集団の91個体について *trnQ-trnS* spacer の配列を決定した。その結果 T-type とハプロタイプ I、C-type とハプロタイプ II が完全に連鎖していることが明らかになった。このことからハプロタイプ I は北東日本ではこれまでの推定 (早池峰山) よりさらに南方の房総半島にまで分布することが推定された。これを確認するために千葉市、佐倉市、市原市でコナラ (*Quercus serrata*) のサンプリングを行ってハプロタイプを決定したところ、市原市で見つかった T-type を示す個体は予想されるようにハプロタイプ I であることが示された。一方、箱根金時山から採集したサンプル中に T-type を示すものが見つかったので、これのハプロタイプを決定したがハプロタイプ I ではないことが判明した。これらのことから北東日本で見られるハプロタイプ II は中央構造線以北に分布すること、ハプロタイプ I は福井県、栃木県、茨城県から房総半島にかけて分布し、日本海側の境界は新潟市付近にあることが

示された (図1). 房総半島では氷河期最盛期のナラ類の花粉が見つかることとも合わせ, ハプロタイプ I を持つものが最終氷期に房総半島に逃避地を持っていたことが推測された. Ohsawa et al. (2012) はマイクロサテライトマーカーを用いて, 北東日本の集団に2つのクラスター, クラスターIとクラスターII, が存在することを見いだした. クラスターIの頻度は北に行くほど高かった. 本研究で得られた知見にてらして, これらのクラスターは, それぞれ葉緑体ハプロタイプIIとハプロタイプIをもつ逃避地集団に起源したと考えられる.

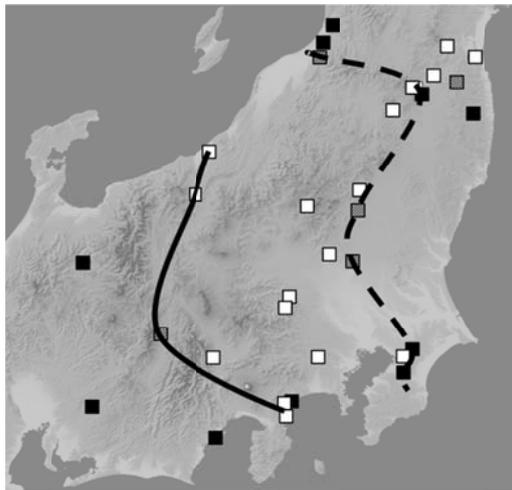


図1. 北東日本の葉緑体ハプロタイプの推定される南限. ハプロタイプ I の南限を点線, ハプロタイプ II の南限を実線で示す. 白い四角は C-type, 黒い四角は T-type, 灰色の四角は C-type と T-type の混在する集団を示す.

## ② フィトクロム遺伝子の分子集団遺伝学的研究

PHYAで1073bp, PHYB/Dで1049bp, PHYEで915bpの配列を決定し, 解析を行った. 北東および南西それぞれの集団グループでPHYAで20と21, PHYB/Dで9と12, PHYEで12と10の多型サイトが見つかった. 同義サイトと非同義サイトに分けてそれぞれ塩基多様度 $\pi$ および塩基差違 $\theta$ を計算した.  $\pi$ については, どの遺伝子においても北東集団グループと南西集団グループで大きな差は見られなかった.  $\theta$ についても $\pi$ と同様に北東集団グループと南西集団グループで大きな差

は見られなかったが, どの遺伝子も非同義サイトより同義サイトの方が多様性が高いという結果が得られた.

集団の分化を AMOVA を用いて解析した. PHYA, PHYB/D, PHYE のすべての遺伝子で南北の地域間の分化は有意ではなかった. 地域内の集団間の分化による分散成分はすべての遺伝子で4%以下であったが, PHYA および PHYE では有意であった. 南北の地域内の集団の遺伝的分化指数  $F_{ST}$  についてみると, PHYA では北東集団グループが 0.00998\*\*, 南西集団グループが 0.05269\* であり, 有意に南西集団グループの値が大きかった. PHYB/D, PHYE は有意ではなかったが, 南西集団グループのほうが分化の程度は大きかった. この結果について中立性の検定を行った. Tajima's test はどの遺伝子の, どの集団グループでも有意ではなかったが, ほとんどで負の値が示された. Fu and Li's test は PHYA について集団全体で統計的に有意であり,  $D^*$ ,  $F^*$  の値はそれぞれ -3.027\*, -0.295\* となったが, 各集団グループでは有意ではなかった. また, イチイガシを外群として用いた MK test では集団全体, 北東集団グループ, 南西集団グループのいずれも有意ではなかった. 次に, 集団全体の塩基置換について非同義サイトと同義サイトの塩基多様度の比  $Ka/Ks$  の値を求めた. その結果, PHYA で 0.085, PHYB/D で 0.425, PHYE で 0.359 となった. PHYB/D および PHYE で選択的制約が弱いのにに対し, PHYA では強い選択的制約がかかっていることが明らかとなったが, 正の選択が働いている証拠は得られなかった.

以上を要約すると, フィトクロム遺伝子については一般に多様性は南西集団グループで高いといえるが, その程度はわずかであった. また北東集団グループと南西集団グループの間で明確な遺伝的分化はどの遺伝子でも起こっていなかった. 中立性の検定の結果からは明らかな正の選択の証拠は得られなかったが, PHYA については強い選択的制約が働いており, 機能的に他の遺伝子よりも重要な役割を担っていることが示唆された.

## ③ フィトクロム遺伝子の発現解析 ヒストン遺伝子で補正したフィトクロム遺伝子,

PHYA, PHYB/D, PHYE のそれぞれの発現量の平均とその標準誤差は  $0.9836 \pm 0.0077$ ,  $0.9537 \pm 0.0073$ ,  $0.9836 \pm 0.0077$  となった。分散分析の結果からいずれの遺伝子もプロット間、集団間、南北集団グループ間では有意差がなかったが、3つの測定時間の間にはすべての遺伝子で 0.1%以下のレベルで有意差があった。PHYA および PHYE では9時に発現量が最も高く 13 時にいったん低下して17時に上昇する傾向があったが、PHYB/D では時間ごとに発現量が低下した。また、すべての遺伝子で集団と時間との間の相互作用に有意差が見られた(いずれも 5%レベル)。南北集団グループ間と時間との相互作用はいずれの遺伝子にも見られなかった。遺伝子の発現量それ自体には集団間もしくは南北間で発現量の差は見られなかったが、時間ごとの発現ととの間に一貫した相互作用が見られたことが注目される。フィトクロムは光強度や波長にตอบสนองしてフェノロジーに関連する様々な反応を起こす発現調節カスケードの頂点にあると考えられるが、それ自身がおそらくフィードバックによる調節を受けており、その調節系に地域差が見られたことが考えられる。自然選択はこのような調節系に働き、フィトクロム遺伝子自身には働かなかったと考えられる。

## (2) 連続的な環境変動の影響の生理生態学的研究

初期の枯死は、愛媛産の個体で多く見られた。開葉時期は、北の産地が3~7日程度速かった。開葉時期に襲ってくる高濃度の対流圏(=地表付近)オゾン濃度が高い時期に関連してオゾンの影響を調べた。同所的に生育するブナに比べると感受性は低かった。産地間差は確認出来なかった。ナラ枯れ侵入の可能性として、北海道南部が挙げられる。ベクターのカシノナガキクイムシは移動性が小さいが、ひとたび侵入すると松前、木古内、黒松内へ至る地域でナラ枯れが生じ、ナラ枯死に至ると思われる。

## 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8件)

① Liu, H.Z., Takeichi, Y., Kamiya, K. and

Harada, K. (2013) Phylogeography of *Quercus phillyraeoides* (Fagaceae) in Japan as revealed by chloroplast DNA variation. J. Forest Res. 18 (4) (in press). (査読あり)

② Liu, H.Z., Harada, K. (2013) Geographic distribution and origin of the chloroplast T/C-type in *Quercus mongolica* var. *crispula* in northeastern Japan. Plant Species Biology (in press). (査読あり)

③ Watanabe, M., Hoshika, Y., Inada, N., Wang XN, Mao, QZ. and Koike, T. (2013) Photosynthetic traits of Siebold's beech and oak saplings grown under free air ozone exposure in northern Japan. Environmental Pollution. 174, 50-56. (査読あり)

④ Kitao, M., Kitaoka, S., Komatsu, M., Utsugi, H., Tobita, H., Koike, T. and Maruyama, Y. (2012) Leaves of Japanese oak (*Quercus mongolica* var. *crispula*) mitigate photoinhibition by adjusting electron transport capacities and thermal energy dissipation along the intra-canopy light gradient. Physiologia Plantarum. 146: 192-204. (査読あり)

⑤ 川口光倫・渡辺 誠・小池 孝良 (2012) 樹木が放出する炭素化合物ガスの役割 —テルペン類に注目して—, 北方林業 64: 173-176. (査読あり)

⑥ 小倉俊治・斎藤秀之 (2012) 木本植物のフロリゲンをコードする遺伝子の発現調節に関する研究動向, 北海道の林木育種, 55(1) 23-29. (査読あり)

⑦ 斎藤秀之・瀬々 潤・清水(稲継) 理恵・神村章子・山田 幸靖・清水 健太郎 (2011) ブナのDNAマイクロアレイの開発, 北海道の林木育種, 54(2): 11-14. (査読あり)

⑧ 原田光・池田創作 (2011) メチオニンシンターゼ遺伝子 (MetE) を用いた日本列島のミズナラの分子集団遺伝学的研究. 林木の育種 241: 1-11. (査読あり)

〔学会発表〕(計12件)

① 稲田直輝, 星加康智, 渡辺 誠, 毛 巧芝, 小池孝良 (2013) ブナとミズナラを対象としたオゾンの光合成への影響~光環境とオゾン

影響の関係。第124回日本森林学会大会，3月26-28日，岩手県盛岡市。

② 斎藤秀之，神村章子，瀬々潤，清水(稲継)理恵，清水健太郎 (2013) ブナの葉の高温ストレス前歴を指標する発現遺伝子のゲノム網羅的解析。第124回日本森林学会大会，3月26-28日，岩手大学(盛岡市)

③ Watanabe, M., Hoshika, Y., Inada, N., Wang, X., Mao, Q. and Koike, T. (2012) Photosynthetic responses of Siebold's beech and oak saplings grown in northern Japan to free air ozone exposure. *Aerosols in East Asia and Their Impacts on Plants and Human Health*, Nov.29-Dec.1, Koganei, Japan.

④ Liu, H.Z. and Harada, K. (2012) Genetic variations and genetic differentiation of *Quercus phillyraeoides* (*Fagaceae*) in Japan revealed by chloroplast DNA variation and microsatellite markers. *Plants 2012 International Conference on Advances in Plant Sciences*. Nov.16-18, Chiang Mai, Thailand.

⑤ 斎藤秀之，小倉俊治，門松昌彦(2012) ブナの花芽分化と花成遺伝子群の発現調節，第61回北方森林学会，11月13日，札幌コンベンションセンター，札幌市

⑥ Harada, K. and Liu H.Z. (2012) Genetic variations and genetic structure of *Quercus phillyraeoides* in Japan revealed by chloroplast DNA variation and microsatellite markers. *IUFRO 2012 Genetics of Fagus and Nothofagus*. Oct. 9-12, Bordeaux, France.

⑦ Liu, H.Z. and Harada, K. (2012) Genetic variations and genetic differentiation of *Quercus phillyraeoides* (*Fagaceae*) in Japan revealed by chloroplast DNA variation and microsatellite markers. 日本遺伝学会第84回大会，9月24-26日，九州大学。

⑧ 渡辺 誠，北岡 哲，江口則和，渡邊陽子，里村多香美，高木健太郎，佐藤冬樹，小池孝良 (2012) 高CO<sub>2</sub>に対するミズナラ萌芽の光合成・成長応答およびうどんこ病発現。第53回大気環境学会年会，9月12-14日，神奈川県横浜市。

⑨ Watanabe, M., Hoshika, Y., Inada, N., Wang, X., Mao, Q. and Koike, T. (2012)

Photosynthetic traits of *Fagus crenata* and *Quercus crispula* sapling grown under free air ozone exposure. *International Conference 'Biological Reactions of Forests to Climate Change and Air Pollution'*, May 18-27, Kaunas, Lithuania.

⑩ 斎藤秀之，石堂 光，神村章子，瀬々潤，清水(稲継)理恵，清水健太郎 (2012) 土壌水分変動がブナ苗木の葉の遺伝子発現に与える影響のゲノム網羅的解析。第123回日本森林学会大会，3月26-29日，宇都宮大学，宇都宮市

⑪ 三好健太・原田光 (2010) ミズナラの光受容体タンパク質フィトクロムの遺伝子クローニング。日本遺伝学会第82回大会，9月20-22日，北海道大学。

⑫ Hashimoto, R., Kai, C. and Harada, K. (2010) Genetic variation of Japanese beech (*Fagus crenata* Blume) in Shikoku island. *XXIII IUFRO World Congress*, Aug. 23-28, Seoul, Korea.

〔図書〕(計2件)

① 原田光 (2012) 「森林遺伝育種学」第2章遺伝学の基本，41-69。文永堂。

② 斎藤秀之(2011) 北海道の樹木の来た道，北海道の樹木(北方森林学会編)，86-87，北海道新聞

## 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

### (3) 連携研究者

斎藤秀之 (SAITO HIDEUKI)

北海道大学・大学院農学研究院・講師

研究者番号：70312395

門松昌彦 (KADOMATSU AKIHIKO)

北海道大学北方生物圏フィールド科学センター・准教授

研究者番号：60158847