

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25292081

研究課題名(和文) 北方針葉樹における標高適応に関わるフェノロジーの分子遺伝機構

研究課題名(英文) Molecular mechanisms for phenology traits related to altitudinal adaptation of a boreal conifer

研究代表者

後藤 晋 (GOTO, Susumu)

東京大学・農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：60323474

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：トドマツの高標高×低標高交配家系から作出した分離集団240個体について、フェノロジーと成長形質を測定し、約500個のSNPマーカーを用いて連鎖地図を作成した結果、染色体数と同じ12連鎖群に収束した。作成した連鎖地図を用いてQTL解析を行った結果、4形質について有意なQTLを検出できた。さらに、部位別に抽出したRNAを利用してトランスクリプトーム解析を行った結果、223,621本のトランスクリプトと71,707個の遺伝子が検出され、トドマツの遺伝子カタログデータベースを作成した。また、適応的遺伝子の季節変動を調べた結果、一部の遺伝子が強い周期性を持つことが判明した。

研究成果の概要(英文)：Phenological and growth traits of 240 seedlings from segregating population of *Abies sachalinensis* derived from crossing between high-altitude and low-altitude origins were mapped on 12 linkage groups, which was constructed from about 500 SNP markers and corresponded to the the number of chromosomes of the species. The QTL analysis significantly revealed five QTLs for four traits. Moreover, the EST library assembled from different tissues detected 223,621 transcripts and 71,707 genes. Based on transcriptome analysis, database for gene catalogue of *Abies sachalinensis* was established. In addition, gene expression analyses of adaptive genes showed seasonal trends in several candidate genes.

研究分野：森林遺伝育種

キーワード：QTL フェノロジー RADseq SNPマーカー リアルタイムPCR トドマツ トランスクリプトーム データベース

## 1. 研究開始当初の背景

植物個体群の高緯度地域への適応は、北の産地ほど冬芽形成期を早くして耐凍性を高めるなど、フェノロジーが重要であることが示されてきた。しかし、緯度が変わると温度と日長の双方が変化することから、温度のみの変動で現存する集団がどのような影響を受けるのかを考えることは難しい。一方、標高勾配の場合、温度が主な環境変動因子となるため、標高適応に関わるフェノロジーの分子遺伝機構の解明は、温暖化後の森林の予測や、その後の適切な森林管理について有用な知見を与えるものと期待される。

私たちは、これまでトドマツ、アカエゾマツ、エゾマツの北方針葉樹 3 種の標高適応に関する研究を進めてきた(H25 科研費 No.25292081)。特にトドマツでは、標高間相互移植試験を通じて、自生地から離れるほど、生存率や樹高が低下するホームサイト・アドバンテージが成り立つことを明らかにした(Ishizuka and Goto 2012)。また、東京大学北海道演習林には、高標高と低標高で相互に交雑した F1 実験個体群が整備されており、それらを交雑した分離集団がすでに準備された状態にあった。したがって、これらの F1 個体群や分離集団を用いることにより、局所適応の重要な鍵となるフェノロジー形質の分子遺伝機構に迫ることができると考えた。

## 2. 研究の目的

日本の北方針葉樹のなかで、トドマツは低地から高山帯におよぶ幅広い標高域に分布し、それぞれの標高に適応した個体群を形成している。本研究では、異なる標高への適応に関わるフェノロジーと繁殖に関わる遺伝子(群)を対象に、実験個体群を用いて、以下の目的で一連の研究を展開する。

(1) 高標高個体と低標高個体の人工交配に由来する分離集団のフェノタイピングを行うとともに、連鎖地図を作成して、フェノロジー・成長形質の QTL マッピングを行う。

(2) 部位別に抽出した RNA をもとに EST ライブラリーを構築し、トドマツの遺伝子カタログ・データベースをつくる。

(3) トドマツ 1 個体から周期的に RNA 分析用サンプルを採取し、適応的遺伝子の季節変動を明らかにする。

(4) 標高間相互交雑試験地を用いて、トドマツの結実球果数に高標高と低標高のゲノム組成が及ぼす影響を明らかにする。

(5) 標高間相互移植試験地、標高間相互交雑試験地を用いて、耐凍性獲得タイミングに高標高と低標高のゲノム組成が及ぼす影響を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) トドマツ連鎖地図を用いたフェノロジー、成長形質の QTL マッピング

分離集団のフェノタイピング

苗畑で育成した分離集団について、週 2~3 日の観察を行い、開芽期、冬芽形成期、二次伸

び時期、耐凍性獲得時期等のフェノロジーのフェノタイピングを行った。

SNP マーカーと連鎖地図作成

一度に大量の SNP 多型を検出できる RAD-seq 法を導入するため、予備的に 4 種類の酵素種の組合せを試し、最適な組合せを明らかにした。最適な組合せで得られた RAD-seq データから SNP ジェノタイプを決定し、JoinMap4.0 と R/qtl によってトドマツの連鎖地図を作成した。

フェノロジーと成長形質の QTL 解析

得られた連鎖地図とフェノタイプデータから QTL を検出した。QTL 解析では、1000 回のシミュレーションで有意な結果が得られたものを採用した。

(2) トドマツのトランスクリプトーム解析

高標高産トドマツ 1 個体から組織別(雄花、雌花、葉、内樹皮)に保存されたトドマツの RNA を用いて、発現している遺伝子のシーケンスを次世代シーケンサー(HiSeq2000)で解読した。収集したリード配列のクリーニングとアセンブルを行い、トドマツのトランスクリプトをまとめた。さらに、得られた結果にアノテーション(解釈)をつけたデータベースを構築した。

(3) 発現遺伝子の季節変動の定量化

季節ごとの発現遺伝子の定量を行うために森林総合研究所北海道支所内の植栽木について樹冠上部、中部、下部、の 3 か所から当年葉および一年葉の採取を週に一度、合計 260 検体の蓄積を行った。2 成長期について 1 か月に 1 回の頻度で RNA を抽出し、リアルタイム RT-PCR で遺伝子発現を調べた。

トドマツ EST ライブラリーから開花関連遺伝子、UV ストレス関連遺伝子、水ストレス関連遺伝子等、計 19 遺伝子(*PaFLT2*、*FLC*、*PaCOL*、*UVH1* など)のプライマーを設計し、2013 年の 8 月、10 月、12 月、2014 年 2 月、4 月、6 月に採取した針葉 18 サンプルの RNA を用い、遺伝子発現量をリアルタイム RT-PCR で解析した。さらに、2013 年 10 月、2014 年 2 月、2014 年 6 月の上部と下部の枝からの RNA 計 6 サンプルについて、RNA-seq データを取得した。

(4) 高標高ゲノム割合と結実球果数の関係

トドマツ標高間相互交雑試験地を利用し、高標高と低標高のゲノム割合が異なる母樹を対象に、毎年、高所作業車を用いて全球果数の調査を行った。

(5) 高標高ゲノム割合と耐凍性獲得タイミング

トドマツ相互交雑試験地を利用し、10 月中旬と 11 月中旬に針葉をサンプリングして、-30 に 5 時間暴露する耐凍性試験を行い、耐凍度を求めた。これらの結果から、高標高と低標高のゲノム割合がトドマツの耐凍性獲得タイミングに及ぼす影響を明らかにした。

#### 4. 研究成果

##### (1) トドマツ連鎖地図を用いたフェノロジー、成長形質の QTL マッピング

###### 分離集団のフェノタイプング

分離集団 240 個体について、発芽当年から 3 成長期までの発芽時期、開芽期、冬芽形成期、二次伸び期を測定した。また、各成長期の終了後に苗高を測定した。発芽時期は二山形の分布を示した(図-1)。2 成長期目の開芽期と冬芽形成期はいずれも一山型の分布を示し、2 次伸びする個体が 60%であった。発芽が遅いほど、初年度の成長は悪かったが、2 年目に二次伸びをする個体は 2 年目以降の成長が大きくなった。また、成長の良い個体は耐凍度が低いという負の相関が認められた。

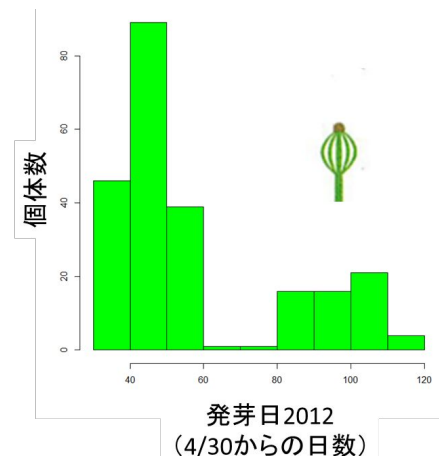


図-1 分離集団の発芽日に関する頻度分布

###### SNP マーカー開発と連鎖地図作成

4 種類の酵素を試した結果、*EcoR* と *Bgl* の組合せで、約 73,000 の候補 SNP 遺伝子座が検出され、そのうち 1500 遺伝子座以上で 24 個体全ての遺伝子型が決定できた。そこで、この酵素ペアで分析を行った結果、トドマツ分離集団の 66,035 の RAD-seq 遺伝子座から P1 (親 1) で 516、P2 (親 2) で 505 の 1:1 に分離する連鎖地図作成に使用できるマーカーが得られた。P1、P2 で疑似検定交配の理論を応用して連鎖地図を作成した結果、いずれもトドマツで予想される 12 連鎖群に収束した。マーカー間の平均距離はいずれも平均で 4cM 程度であった。

###### 分離集団の QTL マッピング

作成した連鎖地図を用いて、フェノロジーと成長形質(発芽日、二次伸びの有無、苗高、耐凍度など)に関する QTL 解析を行った。6 つのフェノロジー、4 つの成長形質の QTL 解析を行ったところ、4 形質について有意な QTL を検出できた。例えば、発芽日について、親 P236 の一つの SNP がヘテロになることで早く発芽することが判明した(図-2)。これらの成果については、2014 年、2015 年 3 月の森林学会で口頭発表し、論文投稿準備中である。

##### (2) トドマツのトランスクリプトーム解析

雄花で 8,554 Mb、雌花で 10,945 Mb、葉で 9,611 Mb、内樹皮で 7,395 Mb、全体で 36.5Gb のシーケンスを次世代シーケンサー (HiSeq2000) で解読した。

収集した 36.5Gb のリード配列のクリーニングと複数の方法でアセンブルを行った結果、平均 955bp ~ 1324bp のトランスクリプトにまとめることができた。これらから最終的に得られたレファレンス配列は、総計 223,621 本のトランスクリプトと 71,707 個の遺伝子から構成され、平均のトランスクリプト長は 1,325bp であった。また、明治大学の矢野研究室との共同により、得られた結果にアノテーション(解釈)をつけたデータベース (TodoFirGene: H28.9 月公開予定) を構築することができた。本成果については、2015 年 3 月の森林学会で口頭発表し、論文投稿準備中である。

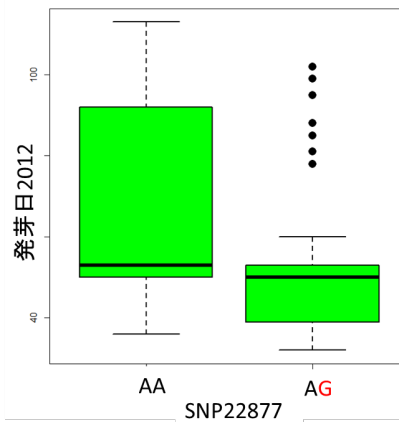


図-2 発芽日に関する親 P236 の SNP の効果

##### (3) 発現遺伝子の季節変動

2 年間の成長期において開花関連遺伝子、ストレス応答遺伝子の季節変動を調べた結果、紫外線応答遺伝子が強い周期性を持つことが判明した。また、開花関連遺伝子の一部が前年の 6 - 8 月に発現していることを明らかにした。また、*PaFL T2*(開花促進遺伝子 *FT* のホモログ)の発現に季節変動(2 月から 4 月かけての発現の減少が顕著)がみられた。リアルタイム PCR の結果と RNA-seq データの結果を比較した結果、同様の傾向がみられた。RNA-seq ではさらに季節によって発現パターンが異なる遺伝子群が認められた。

##### (4) 高標高ゲノム割合と結実球果数の関係

2011 年から 2014 年まで、毎年トドマツ F1 の 21 個体(低標高(L) × 高標高(H)、H × L、L × L、H × H)の球果数の測定を実施した。2011 年と 2014 年にやや豊作となったが、球果数は L × H < L × L < H × L < H × H となり、単にゲノム組成だけの問題ではなく、何らかのエピジェネティックな効果が働いている可能性が示唆された。本成果は、2014 年 3 月の森林学会で口頭発表し、Journal of Forest Research 誌に論文投稿中である。

(5)高標高ゲノム割合と耐凍性獲得タイミング  
高×低の分離集団について耐凍性試験を行った。個体レベルでの耐凍性とサイズには負の相関があり、トレードオフ形質であることが判明した。母樹の遺伝的組成と次世代の耐凍性についてモデルを用いた解析を行った結果、高標高ゲノムを持つ母樹に由来する個体が高い耐凍性を持つことが判明した。本成果については、Frontiers in Plant Science 誌に投稿し、受理された。また、耐凍性獲得タイミングが標高適応に関与するプロセスについて、Plant Biology 誌、低温科学に投稿した論文が受理された。

## 5. 主な発表論文等

後藤 晋・尾張敏章・遠國正樹・松井理生. 2014. 東京大学北海道演習林の異なる 4 標高に植栽されてから 45 年以上が経過した 11 樹種の生存と成長. 東京大学演習林報告 130:15-29(査読有)

Ishizuka W., Ono K., Hara T., Goto S. (2015) Use of intraspecific variation in thermal responses for estimating an elevational cline in the timing of cold hardening in a sub-boreal conifer. Plant Biology, 17, 177-185(査読有)

Ishizuka W., Ono K., Hara T., Goto S. (2015) Influence of low- and high-elevation plant genomes on the regulation of autumn cold acclimation in Abies sachalinensis. Frontiers in Plant Science (Online Early) doi: 10.3389/fpls.2015.00890(査読有)

石塚 航・小野清美・原登志彦・後藤 晋(2015) 北方針葉樹トドマツの低温への適応:耐凍性獲得のタイミングと遺伝的変異. 低温科学 73:81 - 92(査読有)

[雑誌論文] (計 4 件)

後藤晋・石塚航・北村系子・上野真義・久本洋子・岩田洋佳・永野惇・工藤洋(2014) 高標高×低標高トドマツ F2 苗を用いた適応的遺伝子の探索～RADシーケンス法を利用したQTLマッピングの試み～. 日本生態学会大会、3月、広島、

後藤晋・鐘ヶ江弘美・石塚航・北村系子・上野真義・久本洋子・八杉公基・永野惇・工藤洋・岩田洋佳(2014) 高標高×低標高交雑に由来するトドマツ分離集団を用いたRAD-seqによる連鎖地図構築. 日本森林学会、3月、北海道大学、札幌

久本洋子・後藤晋(2015) 高標高トドマツの早熟性はどのように遺伝するのか? . 日本森林学会、3月、北海道大学、札幌

後藤晋・鐘ヶ江弘美・石塚航・北村系子・上野真義・久本洋子・永野惇・岩田洋佳(2016) 標高に沿ったトドマツの表現型変異と適応候補遺伝子へのアプローチ. 日本森林学会、3月、日本大学、神奈川

上野真義・中村雪乃・小林正明・石塚航・内山憲太郎・津山義彦・矢野健太郎・後藤晋(2016) トドマツのトランスクリプトーム解析. 日本森林学会、3月、日本大学、神奈川

(学会発表) (計 5 件)

[その他]

TodoFirGene:トドマツ遺伝子データベース  
<http://plantomics.mind.meiji.ac.jp/todomatsu/>  
\* 2016年9月公開予定

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

後藤 晋(GOTO Susumu)  
東京大学農学生命科学研究科・准教授  
研究者番号:60323474

### (2)研究分担者

北村系子(KITAMURA Keiko)  
国立研究開発法人・森林総合研究所・北海道支所・森林育成研究グループ・主任研究員  
研究者番号:00343814

岩田洋佳(IWATA Hiroyoshi)  
東京大学農学生命科学研究科・准教授  
研究者番号:00355489

上野真義(UENO Saneyoshi)  
国立研究開発法人・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:40414479

久本洋子(HISAMOTO Yoko)  
東京大学農学生命科学研究科・助教  
研究者番号:60586014