

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 5 年 4 月 18 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06124

研究課題名(和文) 局所集団内における乾燥応答性遺伝子の遺伝的変異に基づくブナ林の保全方法の開発

研究課題名(英文) Development of conservation methods for beech forests based on genetic variation in drought-responsive genes within local populations

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ヨーロッパブナで報告されている乾燥関連性遺伝子領域のブナへの適用可能性を調査し、同義置換と非同義置換をともなう一塩基多型を検出した。ブナ実生を用いた圃場実験を行い、乾燥ストレスに対して葉に浸透圧調整物質であるプロリンが蓄積されることが明らかになった。さらに、脂質を分解する酵素、糖タンパク質の生合成、リンゴ酸合成酵素活性、アポプラストに関わる遺伝子群が実験区間で有意に発現変動していた。以上から、ブナの乾燥ストレスに対する生理的・分子生物学的応答の一端を解明し、将来の乾燥ストレスへの応答をモニタリングするためのバイオマーカーの構築に貢献する情報を整理することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現代はこれまでにない急激な気候変動に曝されており、森林植生の保全対策のアップデートが喫緊の課題である。特に、環境変化に対して樹木が常に脆弱であることを前提にするのではなく、樹木自身に秘められた「環境に柔軟に適応していくことのできる能力」を的確に見極めることで対費用効果の高い保全方法を策定する必要性が生じている。本研究は、ブナに元来備わっている環境適応能力を解明することで、将来の気候環境下で要請される森林の保全技術に科学的根拠を提示できるという学術的意義があり、同時に森林保全を通じて森林のもつ公益的機能を十分に発揮させ、安全な人間社会の構築に資する社会的意義も併せ持つものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The applicability of the drought-associated gene region reported in European beech to beech was investigated, and single nucleotide polymorphisms with synonymous and non-synonymous substitutions were detected. Field experiments using beech seedlings revealed that the osmotic regulator proline accumulates in leaves in response to drought stress. Furthermore, the expression of genes involved in lipid-degrading enzymes, glycoprotein biosynthesis, malate synthase activity and apoplast varied significantly between experimental treatments. We have elucidated some aspects of the physiological and molecular biological responses of beech to drought stress and have demonstrated information that will contribute to the biological markers and signals for monitoring future responses to drought stress.

研究分野：森林生態遺伝学

キーワード：ブナ林 乾燥ストレス 一塩基多型 トランスクリプトーム解析 遊離プロリン

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

森林植生は近年の急激な気候変化に起因する自然災害を低減する公益的機能をもつため、森林を保全する社会的要請はより一層高まっている。特に昨今の気候変動で森林は急激な環境変化に曝されているため、植物体が外部環境から受ける刺激（乾燥など）に応答して形成される個体の生存に不可欠な形質（生理機能や形態など）の制御に関わる遺伝子（以後、環境応答性遺伝子）の多様性を保全方法に活用することが求められている。

樹木の環境応答性遺伝子の変異は、これまでに環境が大きく異なる数百 km 以上離れた地域・集団間などの大きな空間スケールで探索され、日本でも積雪環境の異なるスギの集団間（太平洋側 vs. 日本海側）で検出されてきた。一方、数 ha 規模の集団の内部は地域・集団間と比べると環境状態は均一であるため、保全遺伝学の分野では、環境応答性遺伝子はある特定の遺伝子型に固定され、遺伝的変異はないと考えられてきた。しかし、近年の研究から、自然集団内の複数の母樹に由来する実生を均一な環境下で生育させた操作実験では、暗環境や給水制限の下で光合成能力に関わる葉面積や葉内の水分・CO₂ 量の調整に関わる形質に母家系間で差異が認められるなど、環境に応答して生じる個体の形質の変異に遺伝的効果に関与することが明らかになってきた。このことは、集団内の個体間にも環境応答性遺伝子に変異が存在する可能性を示す。さらに、森林生態学の分野では、樹木集団の内部でも土壌水分などの環境は実生・稚樹の定着を規定するほど十分変異に富むことが明らかである。そのため、樹木集団内という局所スケールにおいても環境変異と関連性を示す遺伝的変異が存在するか検証する必要があると考えられる。

2. 研究の目的

将来、日本の優占樹種であるブナの生育地の乾燥化が懸念されることから、乾燥に応答する遺伝子（以後、乾燥応答性遺伝子）を選び、①ブナの地域集団を対象に遺伝子領域内の一塩基多型（以降、SNP）を探索する、②乾燥ストレスに対するブナの集団内と集団間の生理的応答を調査する、③乾燥ストレスに対するブナの集団内の発現変動遺伝子の実態を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

（1）ブナの乾燥応答関連性遺伝子の一塩基多型の探索

日本海側〔大山（鳥取）、白山（岐阜）、白神山地（青森）〕と太平洋側〔段戸山（愛知）、三峰山（三重）、鷹ノ巣山（広島）〕のブナ天然林を対象に、各集団 2 個体から抽出された DNA 試料を用い、ヨーロッパブナで開発された乾燥関連性遺伝子の候補遺伝子領域から 27 箇所の遺伝子領域を増幅するプライマーを選抜した。PCR 増幅とサンガー法による塩基配列決定の後、塩基配列を表す波形が鮮明な遺伝子領域を抽出した。フリーソフト MEGA X v. 10.1.7 を用いてアライメントを行い、アライメントされた塩基配列に BLASTX を適用してエクソン領域とイントロン領域の推定を行うことで、SNP の出現サイトを非翻訳、同義置換、または非同義置換領域に分類した。次に、選別された乾燥関連性遺伝子領域の中から、挿入・欠失がなく、かつ非翻訳あるいはエクソン領域で多く SNP が出現している遺伝子領域を対象に、前述の 6 集団にそれぞれ 4 個体を加え集団あたり 6 個体として遺伝分析を行った。フリーソフト PHASE v. 2.1 を使用してハプロタイプを推定し、ハプロタイプ数、ハプロタイプ多様度、塩基多様度を算出するとともに、AMOVA によって地域間の遺伝的分化の程度を分析した。AMOVA では、集団あたりの個体数が小規模であるため、6 集団を無作為に 3 集団ずつの 2 グループに分割した場合の Φ 統計量を算出し、観察値と比較した。さらに、主成分分析によって集団間の遺伝的類似性を視覚化した。以上の解析には、ソフトウェア R のパッケージ pegas, vegan, および adegenet を用いた。

（2）短期間の乾燥ストレスに対するブナ実生における生体物質濃度の変化

青森県の白岩森林公園と高倉森で採取したブナの種子を恒温室内の照明育成棚で発芽させ、本葉 2 枚が完全に展開したブナ実生を栽培実験に使用した。栽培実験開始前にブナ実生の樹高を測定した後、約 2 週間にわたり乾燥処理区（給水無し）と対照区（2 日に 1 回給水）に分けて栽培した（処理区・産地で各 5 個体）。また、栽培実験終了後の生葉を用いてプロリンと総フラボノイドの濃度をニンヒドリン法と塩化アルミニウム法によってそれぞれ比色定量した。別途実生を用いて葉の生重と乾燥重量を計測し、葉の乾燥重量あたりの生体物質濃度に変換した。そして、樹高を共変量とする一般化線形モデルを構築し、乾燥処理がブナ実生の生体物質の生産へ及ぼす影響を分析した。

（3）短期間の乾燥ストレスに対するブナ実生のトランスクリプトーム解析

土壌への乾燥ストレスによってブナの当年生実生でどのような遺伝子群が発現上昇・低下するかを明らかにするために、福井県荒島岳モッカ平に分布するブナ集団を産地とする実生を用いて、人工気象器内で 12 日間にわたり対照区 5 個体（3 日に 1 回給水）と乾燥処理区 5 個体（給水無し）に分けて栽培した。栽培終了後に葉から全 RNA を抽出し、RNA-seq によりトランスク

リプトーム解析を実施した。RNA-seq で得られたリードに対して Trinity を用いて新規アッセンブリした後、Salmon を用いて各実験区の個体におけるリード数をカウントした。その後、処理区間における発現変動遺伝子を edgeR で検出した。

4. 研究成果

(1) ブナの乾燥応答関連性遺伝子の塩基多型とその地理的傾向

乾燥関連性遺伝子の候補遺伝子 27 遺伝子領域のうち、10 遺伝子領域で単一の PCR 増幅産物が認められ、塩基配列を表す波形が鮮明であり、アライメントすることができた。これら 10 遺伝子領域には、挿入・欠失が合計 29 箇所認められた。SNP 総数は 104 個であり、そのうち、非翻訳領域には 60 個、同義置換領域には 25 個、非同義置換領域には 19 個認められた。

特に多型性が高かった 4 遺伝子領域を用いて集団あたり 6 個体を分析した結果、遺伝子領域あたり 17~36 個のハプロタイプが推定され、非翻訳・同義置換領域の塩基多様度は非同義置換領域の 3.7~8.8 倍の値を示した。対象とした 6 集団を日本海側と太平洋側でグループ化した場合の Φ 統計量は SNP 全体と非翻訳・同義置換領域の SNP で有意な値を示し、さらに考えられる他の 3 集団の組み合わせよりも高い値であった (図-1)。一方、非同義置換領域の SNP に基づく Φ 統計量では、日本海側と太平洋側でグループ化した場合に有意な遺伝的分化は認められなかった (図-1)。

同義置換をとともなう Cry_P2 遺伝子領域の 723 番目のサイトでは、太平洋側集団ではアデニンの出現頻度が高く、反対に日本海側集団ではシトシンの出現頻度が高くなった (図-2)。一方、非同義置換領域をとともなう SNP については、日本海側と太平洋側の地域間で明確なパターンは認められなかった。このうち、JX406444 遺伝子領域の 32 番目のサイトに認められる SNP では、鷹ノ巣山集団のみ、チミンよりもアデニンの出現頻度が高かった (図-2)。

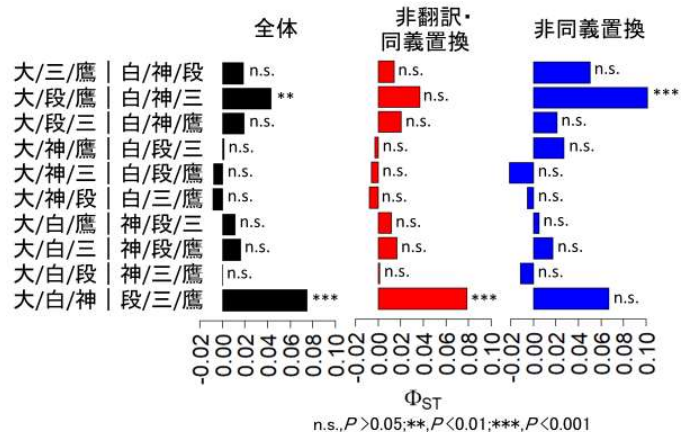


図-1. AMOVA に基づく地域間の遺伝的分化の評価
日本海側と太平洋側の集団でグループ化した場合 (大山/白山/白神山地, 最下段) と 6 集団を無作為に 3 集団ずつ 2 グループに分割した場合 (1~9 段目) の Φ 統計量の比較。大: 大山, 白: 白山, 神: 白神山地, 段: 段戸山, 三: 三峰山, 鷹: 鷹ノ巣山。

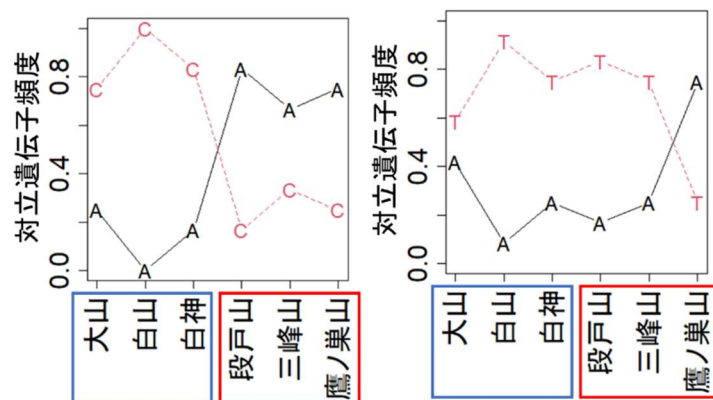


図-2. Cry_P2 の Locus723 (非翻訳・同義置換領域) (左) と JX406444 の Locus032 (非同義置換領域) (右) における各集団の対立遺伝子頻度。
青枠: 日本海側集団, 赤枠: 太平洋側集団。

(2) 短期間の乾燥ストレスに対するブナ実生における生体物質濃度の変化

実験区ごとの葉中の遊離プロリン濃度の推定値は 0.81~3.44 $\mu\text{mol/gDW}$ となり、ヨーロッパブナの当年実生の研究例 (約 0.02~2.01 $\mu\text{mol/gDW}$) の範囲と類似していた。総フラボノイド濃度は 2.70~5.73 mg/gDW の範囲にあり、さまざまな樹齢のヨーロッパブナの個体 (約 3~13 mg/gDW) の範囲内であった。これらの同属の研究結果との比較から、本研究における遊離プロリンと総フラボノイド濃度の推定値は妥当であることが示唆された。

一般化線形モデルによる分析では、葉中の遊離プロリンおよび総フラボノイドの濃度に対する実生の苗高の有意な負の効果が示された。実生の葉に含まれる遊離プロリンと総フラボノイドの濃度は、産地間で有意な差は認められなかった。一方、給水処理は葉の単位乾燥重量あたりの遊離プロリン濃度に大きな影響を与えていた。樹高の影響を一定にした場合、産地にかかわら

ず、対照区よりも乾燥処理区で遊離プロリンの濃度が約1.49倍高く推定された（図-3）。遊離プロリンはブナの乾燥ストレスに対する応答を評価するための有望なバイオマーカーの候補であることが示唆された。一方、葉中の総フラボノイド濃度は、産地にかかわらず、対照区と乾燥処理区の間には有意な差は認められず（図-3）、総フラボノイド濃度は、乾燥ストレスに対する迅速な応答を示すマーカーとしては十分でないことが示された。

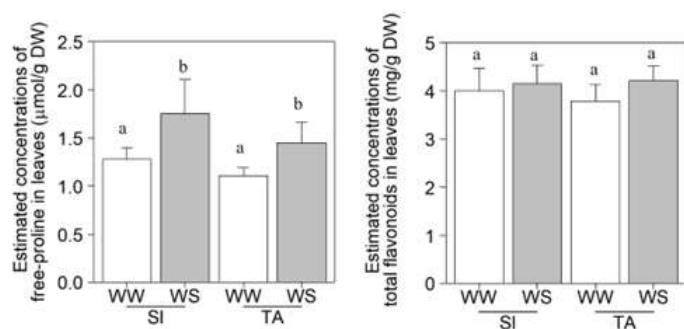


図-3. ブナ実生の葉の乾燥重量中の遊離プロリン濃度（左）と総フラボノイド濃度（右）の推定値。白と灰色の棒グラフはそれぞれ、対照区（WW）と乾燥処理区（WS）を表す。SI：白岩森林公園、TA：高倉山。エラーバーは標準誤差を表す。異なる文字は実験区間の有意な差を表す。

（3）短期間の乾燥ストレスに対するブナ実生の発現変動遺伝子

対照区より乾燥処理区で発現が上昇した遺伝子が 2692 個、低下した遺伝子が 1413 個認められた。BLAST 検索で発現変動遺伝子のうち上位 50 遺伝子の機能解析を行ったところ、87%の遺伝子がアノテーションされた。発現が上昇した遺伝子には *Lipase* や *ATP-binding cassette B19*、低下した遺伝子には *germin-like protein 6* や *ArathNictaba 5* などがみられた。さらにエンリッチメント解析の結果、乾燥処理区で発現量が有意に上昇した遺伝子の GO term には光化学系 I、リンゴ酸合成酵素活性、およびグリオキシル酸回路が多く認められた。一方、乾燥処理区で発現量が有意に低下した遺伝子の GO term には脂質代謝プロセス、キチン結合、およびアポプラストが多く認められた（図-4）。

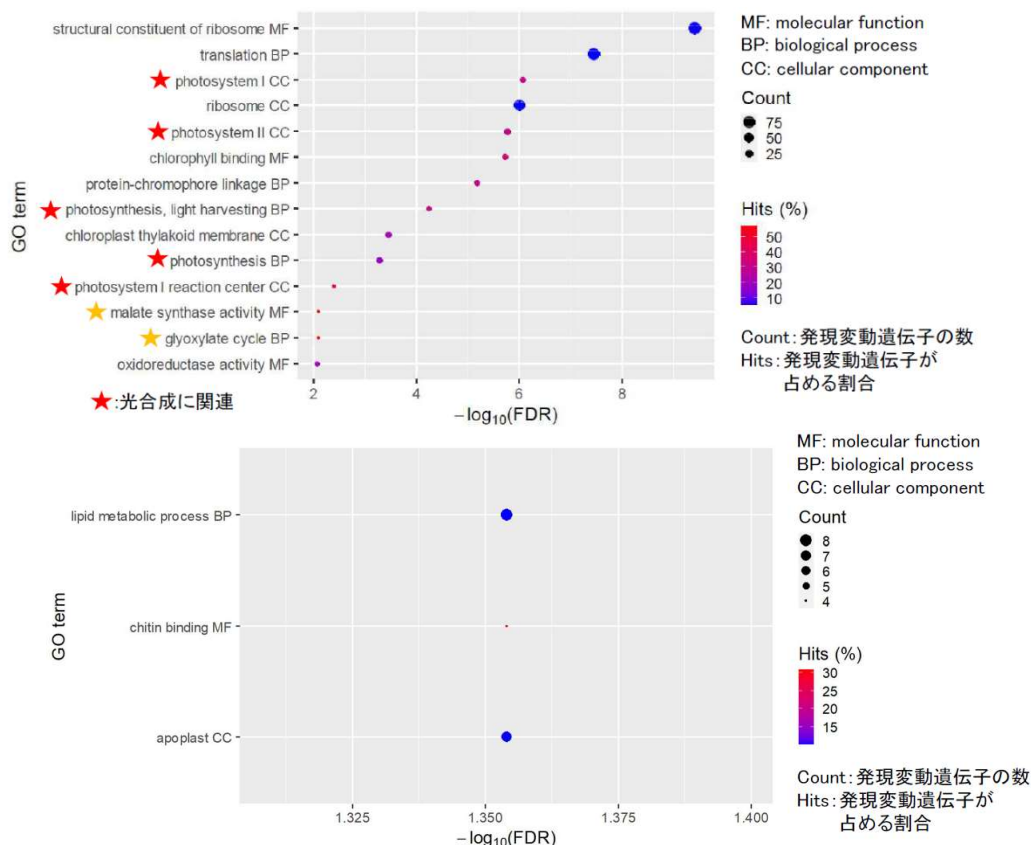


図-4. 対照区よりも乾燥処理区において発現量が上昇した遺伝子で有意に濃縮された GO term（上段）と発現量が低下した遺伝子で有意に濃縮された GO term（下段）。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 榊原朱望・鳥丸猛・赤田辰治・石原正恵・石井弘明・東若菜・戸田求	4. 巻 69
2. 論文標題 ブナの乾燥関連性遺伝子における一塩基多型の探索と地域間の遺伝的分化	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 中部森林研究	6. 最初と最後の頁 5-8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -

1. 著者名 Masashi Tsukamoto, Shinji Akada, Shuichi Matsuda, Hitomi Jouyu, Hiromitsu Kisanuki, Nobuhiro Tomaru, Takeshi Torimaru	4. 巻 125
2. 論文標題 Assessments of fine-scale spatial patterns of SNPs in an old-growth beech forest	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Heredity	6. 最初と最後の頁 240-252
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41437-020-0334-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hinako Ao, Takeshi Torimaru, Yasuaki Akaji, Shinji Akada, Yousuke Matsuda, Hiromitsu Kisanuki	4. 巻 -
2. 論文標題 Free-proline and total flavonoid responses in leaves of Fagus crenata current-year seedlings to short-term soil drought stress	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Sylwan	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.26202/sylwan.2023006	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7件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 青日菜子・鳥丸猛・赤路康朗・赤田辰治・松田陽介・木佐貴博光	
2. 発表標題 短期間の土壌乾燥ストレスに対するブナ実生の特性評価	
3. 学会等名 第133回日本森林学会大会	
4. 発表年 2022年	

1．発表者名 鳥丸猛・成田真智子・赤田辰治
2．発表標題 森林群集・集団内構造と父性繁殖成功の関係
3．学会等名 第133回日本森林学会大会
4．発表年 2022年

1．発表者名 大宮 泰徳・赤田 辰治・鳥丸 猛
2．発表標題 東北ブナつぎ木クローンの開花パターン変動と生育環境の相関解析
3．学会等名 第69回日本生態学会
4．発表年 2022年

1．発表者名 榊原朱望，鳥丸猛，赤田辰治，石原正恵，石井弘明，東若菜，戸田求
2．発表標題 ブナの乾燥関連性遺伝子における一塩基多型の探索
3．学会等名 第10回中部森林学会
4．発表年 2020年

1．発表者名 青日菜子・鳥丸猛・赤路康朗・赤田辰治・松田陽介・木佐貴博光
2．発表標題 短期間の土壌乾燥ストレスに対するブナの当年生実生の葉と根系における遊離プロリンと総フラボノイドの濃度変化
3．学会等名 第12回中部森林学会大会
4．発表年 2022年

1．発表者名 青日 菜子・鳥丸 猛・赤路 康朗・赤田 辰治・松田 陽介・木佐 貫博光
2．発表標題 ブナ実生の土壌乾燥ストレスに対する葉の発現変動遺伝子の探索
3．学会等名 第134回日本森林学会大会
4．発表年 2023年

1．発表者名 鳥丸 猛・山田 ひかり・松下 通也・永松 大・西村 尚之
2．発表標題 ブナ稚樹の個体群動態と林冠状態、地形状況、および種内競争の関係
3．学会等名 第134回日本森林学会大会
4．発表年 2023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
--	---------------------------	-----------------------	----

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