

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

榊原朱望（三重大生資）・鳥丸猛（三重院生資）・赤田辰治（弘前大農生）・石原正恵（京都大フィールド）・石井弘明・東若菜（神戸大院農）・戸田求（広島大院統合生命）

日本海側（大山，白山，白神山地）と太平洋側（段戸山，三峰山，鷹ノ巣山）のブナ天然林を対象に，ヨーロッパブナで報告された乾燥関連性遺伝子 27 遺伝子領域の一塩基多型（以下，SNP）のブナへの適用可能性を試みた。その結果，10 遺伝子領域がブナに適用可能であり，このうち SNP の変異性の高い 4 遺伝子領域を選別した。日本海側と太平洋側の地域間における遺伝的分化は非翻訳領域・同義置換領域で認められたが，非同義置換領域では認められなかった。最も集団サイズが小さく孤立化している鷹ノ巣山集団では，非同義置換をとともなう SNP の対立遺伝子頻度が他の集団と異なり，アミノ酸の性質に変化をとともなう遺伝的浮動の効果の可能性が示唆された。

キーワード：ブナ林，一塩基多型（SNP），乾燥関連性遺伝子，遺伝的分化，同義・非同義置換

I はじめに

ブナ林は，高い水源涵養機能や土壌保全機能，野生動物の生息地として生態学的重要性が認められている (1)。しかし，近年顕著に認められる地球温暖化の影響により，100 年後のブナ林の分布適域は九州，四国，本州太平洋側では消滅，東北では大きく減少することが予想されている (2)。このような将来の気候変化に対して現在のブナ林の保全指針を打ち出すためには，ブナの環境適応能力の評価が重要であるが，その端緒として環境ストレスへの応答を司る遺伝子の多様性の実態を解明する必要がある。植物のストレス応答に関与することが知られている MYB 遺伝子のブナのホモログ (*FcMYB1603*) では，乾燥ストレスに対して発現量の上昇が認められている (3) が，乾燥ストレスと関連したブナの遺伝的変異の探索はこの遺伝子のみで知られており，他の遺伝子を探索する試みは立ち遅れている。すでにブナと同属であるヨーロッパブナでは，複数の乾燥関連性遺伝子の候補遺伝子領域が同定されている (5, 9)。そこで本研究では，それらのヨーロッパブナの情報をもとにブナの乾燥関連性遺伝子の候補遺伝子領域における SNP を検出し，その SNP の地理的パターンの有無を検討することを目的とした。

II 方法

試料を日本海側[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）]のブナ天然林から採取した。各集団において幹同士が 50m 以上離れるように成木（胸高直径 5cm 以上の幹）を 2 個体選び，葉を採取した。そして，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んだ (5, 9)。既往の文献の反応条件 (5, 9) で PCR 増幅を行

い，サンガー法を用いてシーケンシングした。塩基配列を表す波形が鮮明な遺伝子領域を抽出した後，フリーソフト MEGA X v. 10.1.7 (3) を用いてアライメントをおこなった。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い，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 (10) 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 (1) 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 (8) のパッケージ pegas (7)，vegan (6)，および adegenet (2) を用いた。

III 結果

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（表-1）。JX406437 と JX406444 の遺伝子領域では，エクソン領域に同義置換と非同義置換をとともなう SNP がともに多く検出された。加

SAKAKIBARA Akemi, *TORIMARU Takeshi, AKADA Shinji, ISHIHARA Masae, ISHII Hiroaki, AZUMA Wakana, TODA Motomu

Exploration of single nucleotide polymorphisms of drought-related genes and genetic differentiation between regions in beech
torimaru@bio.mie-u.ac.jp

えて、APX4_P2 と Cry_P2 の遺伝子領域では、挿入・欠失がなく、かつイントロン領域に SNP が多数検出された。

上述の 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 (表-2)。

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)。

対象とした遺伝子領域全体と非翻訳・同義置換領域の SNP の主成分分析では、第一主成分の正の方向に太平洋側、負の方向に日本海側の集団がまとまる傾向が認められた (図-2)。このうち、Cry_P2 遺伝子領域の 723 番目のサイトに認められる SNP が第一主成分に最も寄与していた (図-3)。このサイトでは、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-4)。一方、非同義置換領域の SNP の主成分分析では、第一主成分と第二主成分のいずれにおいても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 (図-2)。このうち、第二主成分のばらつきに最も寄与していた JX406444 遺伝子領域の 32 番目のサイトに認められる SNP (図-3) を詳しく見ると、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-4)。

IV 考察

対象とした遺伝子領域の非翻訳・同義置換領域の SNP は、日本海側[大山, 白山, 白神山地]と太平洋側[段戸山, 三峰山, 鷹ノ巣山]に分かれたパターンを示し (図-2, 4)、 Φ 統計量も最も高く、有意な遺伝的分化が認められた (図-1)。同様に、SSR 遺伝子座 14 遺伝子座に基づく日本全国のブナ 23 集団を用いた研究でも太平洋側と日本海側の地域間で遺伝的な分化と地域内の遺伝的類似性が報告されており、これらは日本海側と太平洋側の集団を分ける脊梁山脈などの山脈が歴史的に遺伝子流動の地理的障壁となってきたことが原因と考えられている (12)。

一方、非同義置換領域の SNP には日本海側と太平洋側の地域間に有意な遺伝的分化が検出されず (図-1)、主成分分析の結果からも地域間でのグループ化は認められなかった (図-2)。本研究では、この 2 地域について、積雪量の多寡に起因する冬季の乾燥ストレスの程度の違いを想定したが、今後、生育期間の降水量など、様々な乾燥ストレスと関連する気象パラメータに着目する必要があるだろう。そして、解析する遺伝子領域数、集団数、あるいは個体数を増やし、集団ごとの SNP の対立遺伝子頻度と気象パラメータとの相関関係を分析していく必要が考え

られる。

非同義置換領域の SNP の地理的パターンでは、JX406444 遺伝子領域において鷹ノ巣山集団のみ特異的なパターンが認められた (図-4)。鷹ノ巣山のブナ林面積は約 4ha であり、段戸山 (約 14.3ha)、三峰山 (19.2ha 以上) よりもかなり小面積である。さらに、周辺を針葉樹人工林に囲まれており孤立化している。そのため、一つの可能性として遺伝的浮動によって他の集団と異なる対立遺伝子が優占したことが考えられ、これについて検討するためには、集団あたりの個体数を増やし、遺伝的浮動による遺伝的多様性の低下を定量的に確認する必要があるだろう。この SNP はチミンとアデニンの間の置換であり、アミノ酸の性質も疎水性 (システイン) と親水性 (セリン) の間で変化する (4) ため、アミノ酸の性質の変化を介して機能形質にも影響を及ぼすのかもしれない。JX406444 遺伝子領域は光合成能力に関わるプラストシアニンをコードしている (5) ため、今後、鷹ノ巣山集団とそれ以外の集団でそれぞれ優占している SNP 遺伝子型の個体 (例えば実生) をお互いの生育地環境に即した乾燥ストレスに曝露させ、それらの光合成速度を比較することで機能形質に現れるほどの影響があるのか検証する必要があるだろう。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、三重大学生物資源学部森林保全生態学研究室の皆様には試料提供や、数々のご助言をいただきました。ここに感謝の意を表します。

引用文献

- (1) Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131:479-91
- (2) Jombart T, Ahmed I (2011) adegenet 1.3-1: new tools for the analysis of genome-wide SNP data. *Bioinformatics* 27:3070-3071
- (3) Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K (2018) MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol* 35:1547-1549
- (4) Kyte J, Doolittle RF (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* 157:105-132
- (5) Lalague H, Csillery K, Oddou-Muratorio S, Safrana J, De Quattro C, Fady F, Gonzalez-Martinez SC, Vendramin GG (2014) Nucleotide diversity and linkage disequilibrium at 58 stress response and phenology candidate genes in a European beech (*Fagus sylvatica* L.) population from southeastern France. *Tree Genet Genomes* 10:15-26
- (6) Oksanen J, Blanchet FG, Friendly M, Kindt R, Legendre P, McGlenn D, Minchin PR, O'Hara RB, Simpson GL, Solymos P, Stevens MHH, Szoecs E, Wagner H (2019)

vegan: community ecology package. R package version 2.5-6. <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>

- (7) Paradis E (2010) pegas: an R package for population genetics with an integrated-modular approach. *Bioinformatics* 26:419-420
- (8) R Development Core Team (2018) R v.3.5.2: a language and environment for statistical computing. R foundation for statistical computing, Vienna, Austria
- (9) Seifert S, Vornam B, Finkeldey R (2012) DNA sequence variation and development of SNP markers in beech (*Fagus sylvatica* L.). *Eur J For Res* 131:1761-1770
- (10) Stephens M, Donnelly P (2003) A comparison of bayesian

methods for haplotype reconstruction from population genotype data. *Am J Hum Genet* 73:1162-9

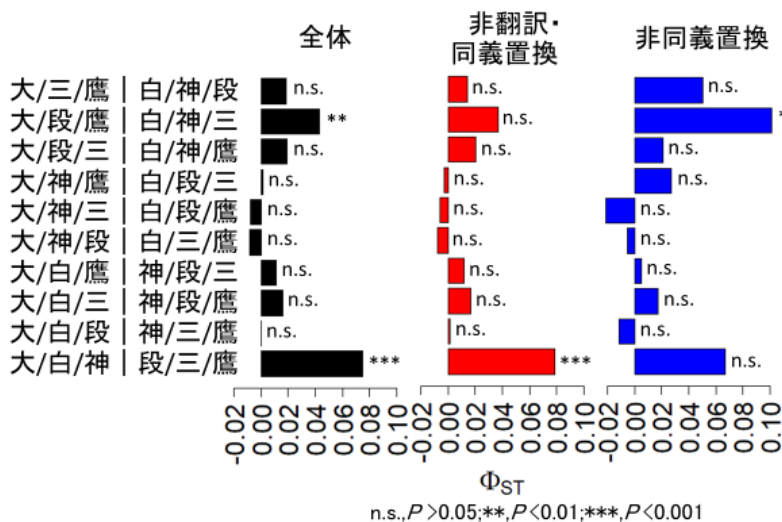
- (11) 田中信行・松井哲也・八木橋勉・埤田宏 (2006) 天然林の分布を規定する気候要因と温暖化の影響予測：とくにブナ林について. *地球環境* 11:11-20
- (12) 戸丸信弘 (2013) 日本の森林樹木の地理的遺伝構造 (2) ブナ (ブナ科ブナ属). *森林遺伝育種* 2:56-61
- (13) Tsukamoto M, Akada S, Matsuda S, Jouyu H, Kisanuki H, Tomaru N, Torimaru T (2020) Assessments of fine-scale spatial patterns of SNPs in an old-growth beech forest. *Heredity* 125:240-252

表一. 乾燥関連性遺伝子の候補遺伝子 10 遺伝子領域の挿入・欠失・SNP の概要

遺伝子 ID	解析長 (bp)	挿入・欠失	SNP			
			総数	非翻訳	同義置換	非同義置換
ALDH	361	2	7	1	4	2
APX4_P1	651	0	6	6	0	0
APX4_P2	817	0	15	13	1	1
APXLb_P2	773	1	4	2	1	1
Cry_P1	791	22	26	26	0	0
Cry_P2	731	0	12	10	1	1
Dhn	450	4	8	2	2	4
JX406436	461	0	4	0	1	3
JX406437	702	0	12	0	8	4
JX406444	433	0	10	0	7	3
合計	6170	29	104	60	25	19

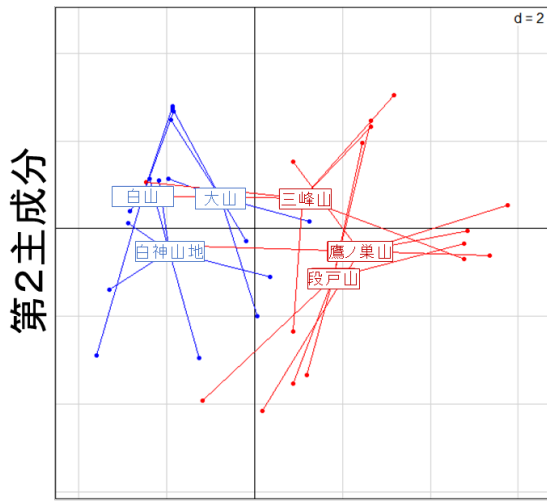
表二. 選別された乾燥関連性遺伝子の候補遺伝子 4 遺伝子領域の遺伝的多様性

遺伝子 ID	ハプロタイプ数	ハプロタイプ多様度	塩基多様度 (π)		
			全体	非翻訳・同義置換	非同義置換
APX4_P2	36	0.963	0.00426	0.00607	0.00110
Cry_P2	25	0.837	0.00517	0.00709	0.00188
JX406437	29	0.943	0.00463	0.01377	0.00156
JX406444	17	0.829	0.00437	0.01233	0.00176

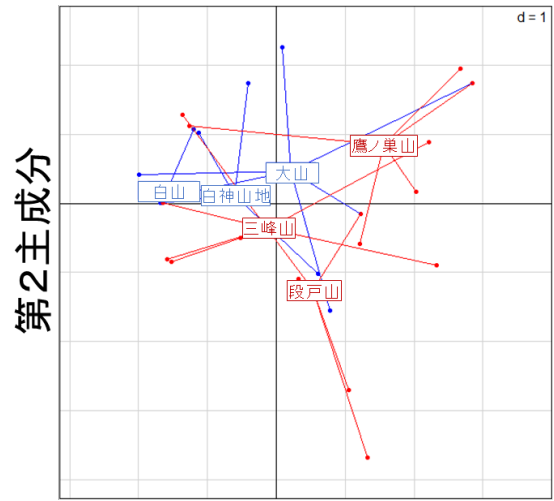


図一. AMOVA に基づく地域間の遺伝的分化の評価

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。



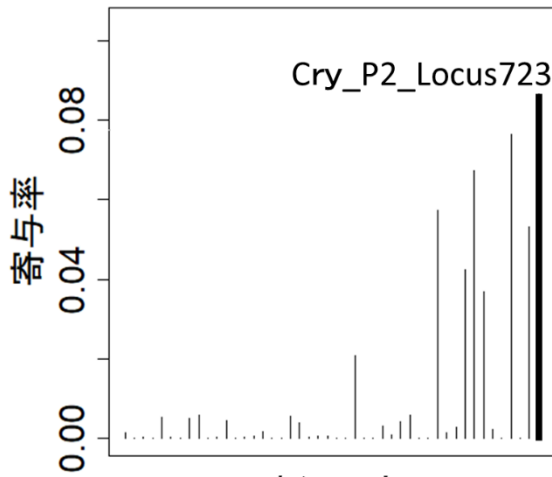
第1主成分



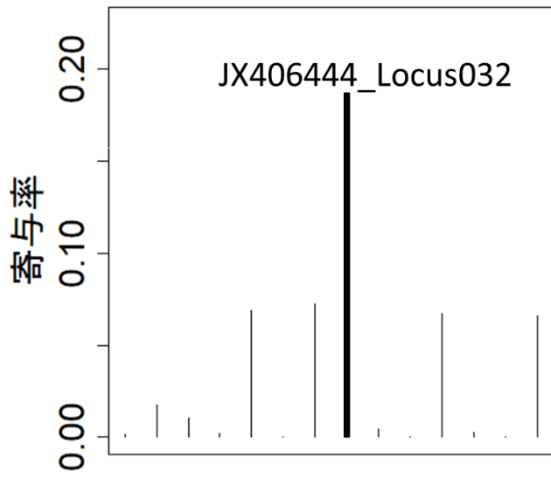
第1主成分

図-2. 非翻訳・同義置換領域（左）と非同義置換領域（右）のSNPにおける主成分分析

図中の点は個体を示し、集団に属する個体の重心位置に集団名を記した。青：日本海側集団、赤：太平洋側集団。



遺伝子座



遺伝子座

図-3. 非翻訳・同義置換領域（左）と非同義置換領域（右）の主成分分析における各SNPの寄与率

非翻訳・同義置換領域では第一主成分，非同義置換領域では第二主成分における寄与率が示されており，最も寄与率の高い遺伝子座名を図中に記した。

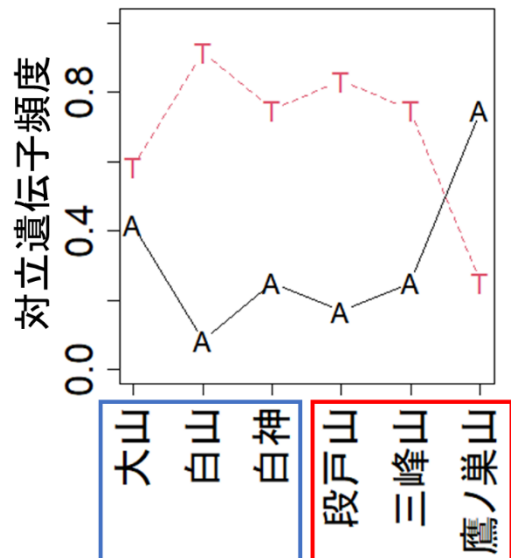
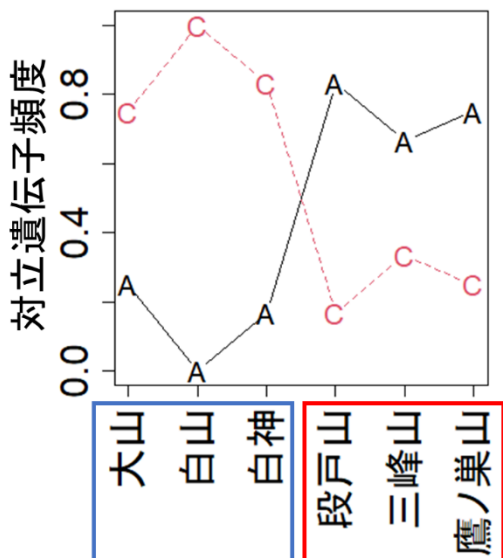


図-4. Cry_P2 の Locus723（非翻訳・同義置換領域）（左）と JX406444 の Locus032（非同義置換領域）（右）における各集団の対立遺伝子頻度

青枠：日本海側集団，赤枠：太平洋側集団。