

森林総合研究所

第2 期中期計画成果集

重点課題イアa

森林生物の生命現象の解明



独立行政法人 森林総合研究所
Forestry and Forest Products Research Institute

はじめに

生物機能を活用した新技術の創出に資するため、森林生物のゲノム情報の充実を図り、遺伝子の機能及びその多様性、環境ストレス応答機構等樹木の生命現象の解明並びにきのこ類及び有用微生物の特性の解明を進めました。

樹木のゲノム情報では、ポプラ完全長 cDNA を約 2 万種収集し、DNA マイクロアレイによる網羅的解析により多数の環境ストレス応答性遺伝子を特定しました。スギでも、雄花由来の完全長 cDNA を約 1 万種、花粉や辺材由来の発現遺伝子を収集し、機能付けを行い、新たな花粉アレルゲン遺伝子の候補を単離しました。収集した塩基配列情報は森林生物遺伝子データベース (ForestGEN) から公開し、多くの研究者に利用されています。また、次世代シーケンサーを用いてシイタケのゲノムを解読しました。

ポプラに及ぼす放射線の影響を解明し、放射線から樹木が防御する仕組みを DNA 修復酵素遺伝子の発現と関連付けて説明しました。ポプラのオゾン傷害発生にエチレン合成が深く関与することを解明し、遺伝子組換え技術を用いオゾン耐性組換えポプラの開発に成功しました。また、遺伝子組換え技術を用いて、ポプラの花成制御や成長制御の仕組みを明らかにしました。その他にも、スギの花成制御遺伝子の単離と機能解明、シイタケの子実体形成に関わる遺伝子の単離や機能解明、白色腐朽菌のリグニン分解機構の解明に成功しました。

スギ天然林やヒノキ天然林の遺伝構造を解明し、それぞれの地域分化に寄与する適応的遺伝子の候補を特定しました。絶滅が危惧される樹種について、風媒繁殖様式を持つユビソヤナギや虫媒繁殖様式のクロビイタヤを事例に、森林の断片化が遺伝的多様性と遺伝子流動にどのように影響するかを明らかにしました。トウヒ属について広域分布種から絶滅危惧種まで数種を含めて地理的遺伝構造を明らかにしました。一方、ヒラタケ属きのこ“バイリング”の分類学的位置を明らかにするとともに、アジア産マツタケの原産地判別法を開発し、きのこのトレーサビリティの確立に貢献しました。

平成 23 年 3 月

独立行政法人 森林総合研究所
研究コーディネータ 篠原健司

編集委員会

編集委員長
編集委員

研究コーディネータ
森林遺伝研究領域長
生物工学研究領域長
きのこ・微生物研究領域長

篠原健司
吉丸博志
丸山 毅
馬場崎勝彦

第2期中期計画成果集 イア a

目 次

はじめに	1
------------	---

I . 森林生物のゲノム情報の大規模収集

ポプラから約 20,000 種類の遺伝子を収集しました	4
ポプラから 19,841 種類の遺伝子（完全長 cDNA）を単離し、それらの塩基配列を解読しました。	
ポプラの環境ストレス応答性遺伝子を大規模解析しました	6
DNA マイクロアレイを用いて、ポプラの環境ストレス応答性遺伝子を 2,214 種類同定しました。	
スギの花粉や雄花由来の発現遺伝子を大規模収集し、 多数のアレルゲン候補遺伝子を発見しました	8
スギの花粉や雄花でどのような遺伝子が働いているかを解析し、アレルゲン候補遺伝子を発見しました。	
心材成分生成時にスギの辺材で発現する遺伝子を大量に収集しました	10
心材成分の生成に関連する遺伝子を調べるため、スギの辺材で発現している遺伝子を初めて大量に収集しました。	
次世代シーケンサーによるシイタケゲノムの解読をしました	12
次世代シーケンサーとスーパーコンピュータにより、シイタケのゲノム DNA 解読を行いました。	

II . 森林生物の生物機能の解明

放射線は樹木にどのような影響を及ぼすのか明らかにしました	14
放射線によって引き起こされたポプラの異常を調べ、放射線障害の防御にかかわる遺伝子を明らかにしました。	
オゾン耐性組換えポプラは耐乾燥性や耐塩性を保持することを明らかにしました	16
オゾン耐性遺伝子組換えポプラの作出に成功し、耐乾燥性や耐塩性も保持することを明らかにしました。	
ポプラの成長を制御することに成功しました	18
遺伝子組換え技術を用いて、植物ホルモンを代謝する酵素遺伝子の発現を制御することで、ポプラの成長を制御することに成功しました。	
ポプラの着花を制御することに成功しました	20
遺伝子組換え技術を用いて、花成誘導遺伝子や花成抑制遺伝子の発現を制御することで、ポプラの開花を自在に制御しました。	
スギ花成制御遺伝子の単離と機能解析に成功しました	22
スギの花成制御遺伝子を単離し、それらの遺伝子の機能について解析しました。	
きのこの子実体形成に関連する遺伝子を特定しました	24
きのこの子実体形成には、光や重力などの環境刺激が重要であることが分かってきました。	
白色腐朽菌のリグニン生分解は菌糸先端でおきることを明らかにしました	26
白色腐朽菌は過酸化水素を菌糸先端部で生産し、リグニン分解酵素を働かせることを明らかにしました。	

Ⅲ．森林やきのこの遺伝構造の解明

- ウラスギとオモテスギの地域分化を示す遺伝子を発見しました …………… 28**
スギの多数の遺伝子を用いて、オモテスギとウラスギの地域分化に関連している遺伝子を見いだしました。
- 貴重なヒノキ天然林の遺伝的特徴を明らかにしました …………… 30**
ヒノキ天然林の地理的分化の解明や適応的遺伝子候補の検出を行い、保全や活用に必要な情報を得ました。
- トウヒ属樹種の地理的遺伝構造を明らかにしました …………… 32**
日本海周辺地域のエゾマツ変種群や本州中部のヤツガタケトウヒなど、トウヒ属数種の地理的遺伝構造を解明しました。
- 希少樹種ユビソヤナギの遺伝構造と遺伝的多様性を明らかにしました …………… 34**
溪畔林の希少樹種ユビソヤナギで、河川開発による遺伝構造の変化と多様性の衰退を明らかにしました。
- 希少樹種クロビイタヤの生育地断片化が遺伝子流動に与える影響を明らかにしました …………… 36**
虫媒の希少樹種クロビイタヤで、断片林分間の自然環境が遺伝子流動に重要であることを示しました。
- ヒラタケ属きのこ“バイリング”の分類学的位置を明らかにしました …………… 38**
バイリングがエリングと同種であることを明らかにし、種苗登録で想定される所属種の問題を解決しました。
- アジア産マツタケの DNA 原産国判別法を開発しました…………… 40**
レトロトランスポゾンのDNA配列を指標にして、アジア産マツタケの原産国を判別する方法を開発しました。

ポプラから約 20,000 種類の遺伝子を収集しました

生物工学研究領域	楠城時彦、西口 満、二村典宏、伊ヶ崎知弘
森林遺伝研究領域	角 友之（現在の所属：総合研究大学院大学）
研究コーディネータ	篠原健司

ポプラは、樹木で最初にゲノム配列が解読された樹種です。私たちは、ポプラの遺伝子を 19,841 種類収集し、それらの塩基配列を解読しました。これは、ポプラの総遺伝子数の約 40%に相当するもので、樹木の生理機能の研究にとってたいへん重要な知見となります。また、集めた遺伝子を詳しく調べることで、乾燥や高塩濃度などに強い樹木の開発といった次世代のバイオテクノロジーに貢献することができます。

研究の背景と目的

ポプラは、建材や薪炭材として利用される実用林木であるだけでなく、樹木で最初にゲノムが解読された重要なモデル樹木です。しかし、樹木の生理機能の裏付けとなる遺伝子機能を効率的に解析するためには、ゲノム情報だけでは不十分であり、細胞内で機能する遺伝子をできるだけ多く集める必要があります。本研究は、組換え樹木の開発などに役立つ有用な遺伝子を大規模に収集することを目的としました。

ポプラ遺伝子の大規模収集

ポプラ（セイヨウハコヤナギ、*Populus nigra* var. *italica*）の葉、茎、根や花の各器官、また乾燥、高塩濃度や低温などの環境ストレス処理をした葉から調製した mRNA を鋳型にして、完全長 cDNA ライブラリーを作製しました。完全長 cDNA は、遺伝子の機能解析や組換え体の作出にとって有用なバイオリソース（生物資源）です。110,000 個以上のポプラ cDNA の塩基配列を解析した結果、様々な機能を持つ 19,841 種類の遺伝子を同定しました（図 1）。この数値は、ポプラのゲノムの概要解読から推定される遺伝子数の約 40% に相当します。ポプラ

完全長 cDNA の中には多数の重要な遺伝子が含まれていました。また、収集した遺伝子は 19 本の染色体上にほぼ均等に分布することも明らかになりました（図 2）。

このような完全長 cDNA の大規模収集は、樹木では他に例を見ません。ポプラ完全長 cDNA は、樹木の構造ゲノム学的研究だけでなく、機能ゲノム学的研究の進展に大きく貢献します。また、遺伝子組換えによる高環境耐性樹木や高バイオマス生産性樹木の開発、あるいは遺伝子マーカーとして用いることで精英樹の選抜などに応用できます。今後は、ポプラ完全長 cDNA をもとに DNA マイクロアレイによる発現遺伝子の網羅的解析を進め、樹木の様々な生理機能の解明に挑戦する予定です。そして、ポプラのバイオリソースの配布を通じて国際貢献に努め、樹木研究の発展に貢献したいと考えています。

本研究は、交付金プロジェクト「ポプラ等樹木の完全長 cDNA 塩基配列情報の充実」により行いました。また、（独）理化学研究所植物科学研究センター（篠崎一雄センター長）との共同研究として推進しました。

詳しくは Nanjo et al. (2007) BMC Genomics 8: 448 をご覧下さい。

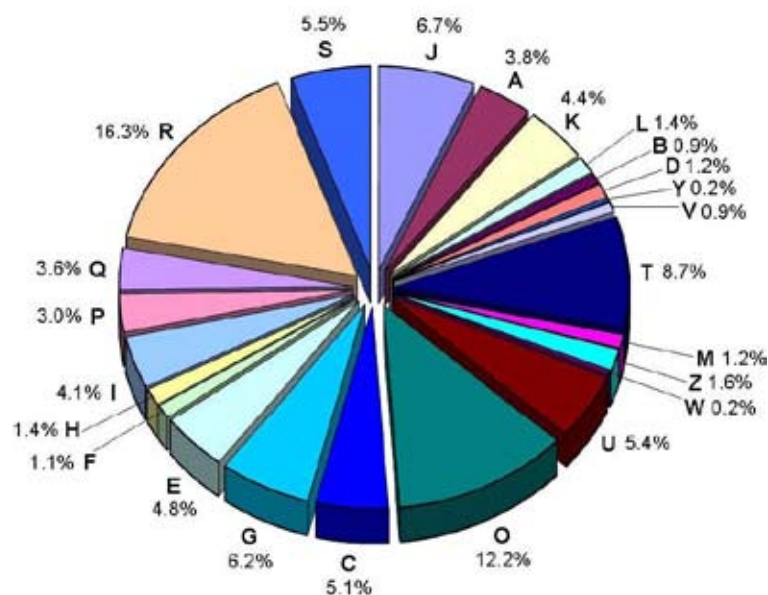


図1. ポプラ完全長 cDNA の機能分類

約2万種類のポプラ完全長 cDNA をそれぞれの塩基配列がコードするタンパク質の機能によって分類しました。J: タンパク質の翻訳, A: RNA のプロセッシングと修飾, K: 転写, L: DNA の複製・組換え・修復, B: クロマチンの構造変換, D: 細胞周期・細胞分裂の制御, Y: 核構造, V: 防御機構, T: シグナル伝達, M: 細胞壁・細胞膜の合成, Z: 細胞骨格, W: 細胞外構造, U: 細胞内輸送・分泌, O: タンパク質の翻訳後修飾・代謝, C: エネルギー生産・変換, G: 炭水化物の輸送・代謝, E: アミノ酸の輸送・代謝, F: 核酸の輸送・代謝, H: 補酵素の輸送・代謝, I: 脂質の輸送・代謝, P: 無機イオンの輸送・代謝, Q: 二次代謝産物の合成・輸送, R・S: 不明

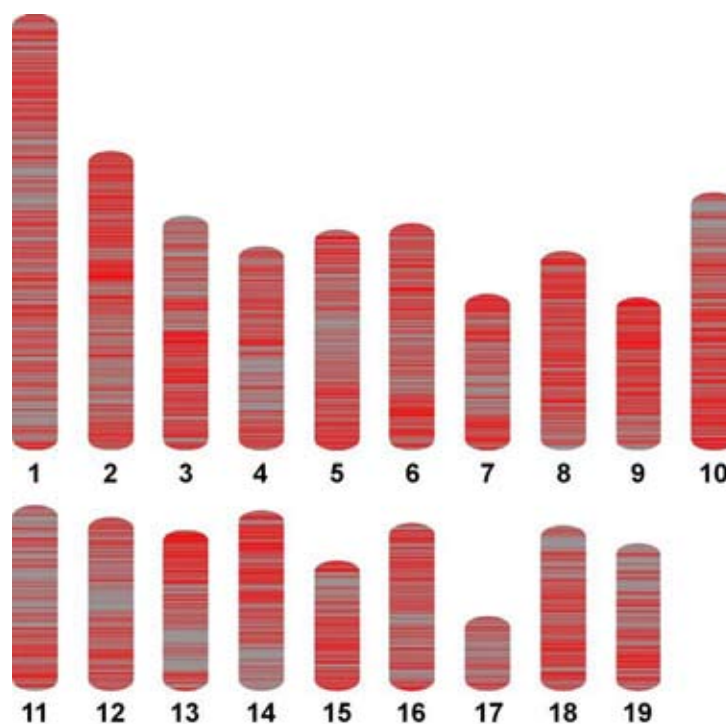


図2. ポプラ完全長 cDNA の染色体上での位置

ポプラのゲノム情報をもとに、私たちが収集した約2万種類のポプラ完全長 cDNA を染色体上にマッピングしました。棒状の図形は各染色体を示しています（染色体番号1～19）。赤い部分がポプラ完全長 cDNA の位置を示しています。

ポプラの環境ストレス応答性遺伝子を大規模解析しました

生物工学研究領域
研究コーディネータ

楠城時彦、西口 満
篠原健司

本研究では、乾燥、高塩濃度や低温等の環境ストレスに対する樹木の分子応答機構を解析するために、DNA マイクロアレイによるポプラ遺伝子の網羅的発現解析を行いました。DNA マイクロアレイを使うと、数万種から数十万種におよぶ遺伝子の発現を一回の実験で解析することができます。本研究では、ポプラの DNA マイクロアレイを使って、環境ストレスを加えた時に発現が変動する遺伝子を 2 千種類以上同定しました。それらの遺伝子群には、高環境ストレス耐性組換え樹木の作出への応用が期待される有用遺伝子候補が多数含まれていました。

研究の背景と目的

樹木の環境ストレス応答機構や耐性機構の解明は、持続的な環境保全を考える上で大変重要な課題です。本研究は、DNA マイクロアレイを用いてポプラの遺伝子の発現を網羅的に調べ、樹木の環境応答機構を明らかにするとともに、有用組換え樹木の開発に結びつく候補遺伝子の探索を目的としました。

DNA マイクロアレイによる遺伝子発現の網羅的解析

DNA マイクロアレイは、ガラスやプラスチックなどの基板の上に多数の DNA 断片や合成オリゴヌクレオチドを貼り付けた実験器具で、DNA チップとも呼ばれます。DNA マイクロアレイを使うと、数万種から数十万種におよぶ遺伝子の発現を一回の実験で解析することができます。本研究では、ポプラゲノム上にある遺伝子のほとんどすべてを搭載した DNA マイクロアレイを用いました。

ポプラ（セイヨウハコヤナギ、*Populus nigra* var. *italica*）の葉に、乾燥、高塩濃度、低温やアブシジン酸（ABA）のストレス処理（0、2、10 時間）を加えました。ストレス処理前と処理後の本葉から抽出した RNA を DNA マイクロアレイと反応させることにより、ストレスに応答して発現が変化する遺伝子を解析しました。

ポプラのストレス応答性遺伝子の特定

乾燥、高塩濃度、低温及びアブシジン酸いずれかの処

理によって、発現が有意に変動する遺伝子を 2,214 種同定しました。それらのうち、ストレスにより発現レベルが上昇するものが 1,382 種、発現レベルが下降するものが 843 種でした（図 1）。また、同一のストレス処理でも処理時間（2、10 時間）により発現変動の上昇と下降が逆転するものが 11 種ありました。特に、ストレスによって発現レベルが上昇する、つまりストレス時に積極的にタンパク質を合成する遺伝子の中には、オリゴ糖やアミノ酸の合成酵素遺伝子、転写因子やプロテインキナーゼなどストレスシグナルの伝達に関わる遺伝子などが含まれていました（表 1）。これらの遺伝子は、いずれも樹木の環境ストレス応答に深く関わっている可能性があります。

本研究で得られた成果は、樹木の環境ストレス応答機構解明にとって重要な知見であるだけでなく、樹木独自のストレス誘導性プロモーターの開発、環境ストレス耐性遺伝子組換え樹木の開発、さらに耐性品種の DNA 選抜マーカーの開発にも役立ちます。

本研究は、交付金プロジェクト「ポプラ等樹木の完全長 cDNA 塩基配列情報の充実」により行いました。

詳しくは Nanjo et al. (2007) BMC Genomics 8: 448 をご覧下さい。

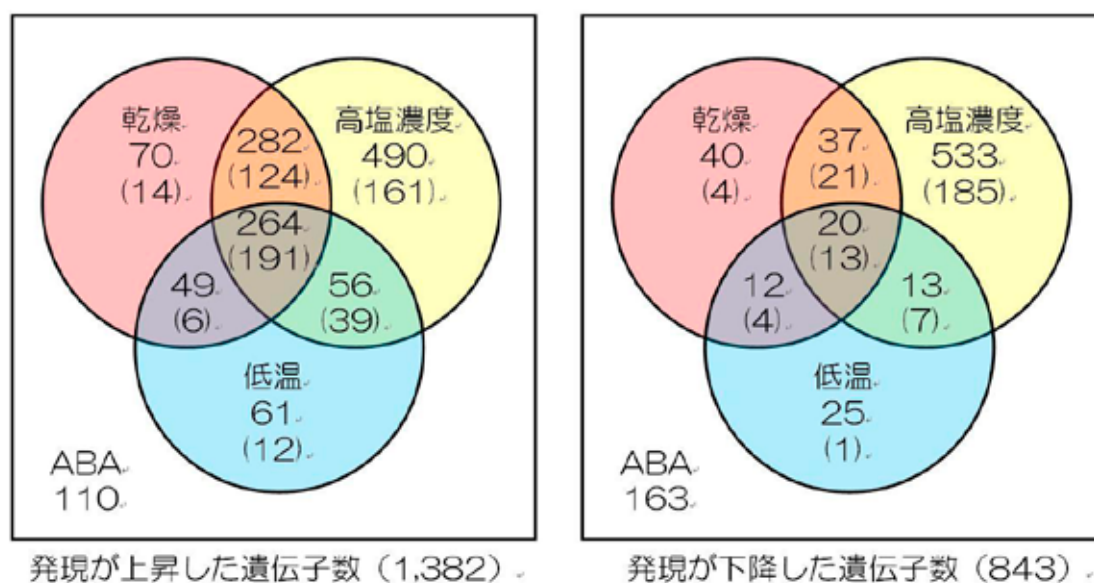


図1. ストレス処理により発現が変動したポプラの遺伝子数

乾燥、高塩濃度、低温、アブシジン酸（ABA）の各処理により発現が変動した遺伝子数。左がストレス処理により発現が上昇した遺伝子グループ、右がストレス処理により発現が下降した遺伝子グループ。括弧内は各処理区のうち ABA 処理による発現変動が見られたもの（内数）を示します。

表1. ストレス処理により発現が上昇したポプラ遺伝子から推定したタンパク質の機能

タンパク質の機能	ストレス処理
オリゴ糖合成酵素	乾燥、高塩濃度、低温、アブシジン酸（ABA）
チトクローム P450	乾燥、高塩濃度、低温、アブシジン酸（ABA）
プロテインキナーゼ	乾燥、高塩濃度、低温、アブシジン酸（ABA）
転写因子（DNA 結合タンパク質）	乾燥、高塩濃度、低温、アブシジン酸（ABA）
水輸送タンパク質	乾燥、高塩濃度
アブシジン酸合成酵素	乾燥
脂肪酸不飽和化酵素	低温
イオン輸送タンパク質	高塩濃度
アミノ酸（プロリン）合成酵素	高塩濃度

スギの花粉や雄花由来の発現遺伝子で大規模収集し、 多数のアレルゲン候補遺伝子を発見しました

生物工学研究領域
森林遺伝研究領域
研究コーディネータ

二村典宏、西口 満
伊原（宇治野）徳子、吉村研介
篠原健司

スギ花粉症は国民の25%以上が発症しているとも言われており、我が国の社会問題の一つになっています。花粉症をはじめとするアレルギーの原因となる物質のことをアレルゲンといいます。スギ花粉アレルゲンは既に複数明らかになっていますが、その全体像は明らかになっていません。そこで、スギの花粉や雄花で働く遺伝子を解析することにより、未知のスギアレルゲンを探索しました。その結果、既知のアレルゲンと類似している遺伝子を多数見つけました。アレルゲンに類似するスギ遺伝子の情報は、スギ花粉症の治療や診断の高度化に役立ちます。

研究の背景と目的

近年におけるスギ花粉症患者の急増は、深刻な社会問題となっています。くしゃみ、鼻水などの花粉症の症状を引き起こす原因物質として、Cry j 1, Cry j 2 等と名付けられたタンパク質（アレルゲン）が特定されています。しかし、スギ花粉にはまだ特定されていないアレルゲンが多数あると考えられています。私たちは、未知のスギ花粉アレルゲンを探索するために、スギの花粉や雄花でどのような遺伝子が働いているかを解析しました。

スギの花粉と雄花で働く遺伝子の解析

スギのゲノムはヒトの3倍以上ありますが、そのうち花粉や雄花の発達に関わっている遺伝子領域はごく一部に限られます。遺伝子領域のDNAからはmRNAが転写され、この情報をもとにタンパク質が合成されます。スギの花粉や雄花で働いている遺伝子を解析するためには、花粉や雄花からmRNAを抽出し、これをもとにcDNAを合成します（図1）。ある器官で働く様々な遺伝子から転写されたmRNA（メッセンジャーRNA）をもとに作成したcDNAのセットのことをcDNAライブラリーといいます。本研究では、スギの花粉と雄花のcDNAライブラリーを解析することにより、どのような遺伝子が働いているか、さらには既知の植物アレルゲンと類似している遺伝子があるかを調べました。このうち雄花のcDNAライブラリーは、完全長cDNAから構成されています。

私たちはスギ花粉と雄花のcDNAライブラリーから、それぞれ1,929個と19,437個のcDNAをピックアップして塩基配列を解析しました。cDNAの塩基配列情報を整理した結果、それぞれ1,365個と10,463個の遺伝子を同定することができました。それらの中には、様々な機能を持つ遺伝子が含まれおり、過去に報告の無かった

遺伝子があることも分かりました（図2）。

スギ花粉中のアレルゲン類似遺伝子の解析

スギ花粉で働く遺伝子の中に既知の植物アレルゲンと類似している遺伝子がないかを調べたところ、アレルゲンと類似している遺伝子が180種類見つかりました（表1）。今後検証していく必要がありますが、これらの遺伝子から作られるタンパク質はアレルゲンとして働いている可能性があります。

収集した塩基配列データは公的データベースに登録するとともに、森林総合研究所独自の情報提供の場として森林生物遺伝子データベース（ForestGEN; <http://forestgen.affrc.go.jp/ja/index.html>）を構築し、整理・統合した塩基配列情報を公開しています。ForestGENでは、グラフィカルで直感的な高性能ビューアを採用しており、データの瞬時参照を実現しています。キーワードによる検索や配列の類似性検索も可能であることから、アレルゲンに類似するスギ遺伝子の情報を花粉症の治療・診断のための医学研究に役立てるといった用途での活用が期待されます。

本研究は、森林総合研究所の交付金プロジェクト「ポプラ等樹木の完全長cDNA塩基配列情報の充実」及び農林水産省の新たな農林水産政策を推進する実用技術開発事業「スギ雄花形成の機構解明と抑制技術の高度化に関する研究」により、理化学研究所植物科学研究センター他との共同研究で実施したものです。

詳しくはFutamura et al. (2006) Tree Physiology 26: 1517-1528 及び Futamura et al. (2008) BMC Genomics 9: 383 をご覧下さい。

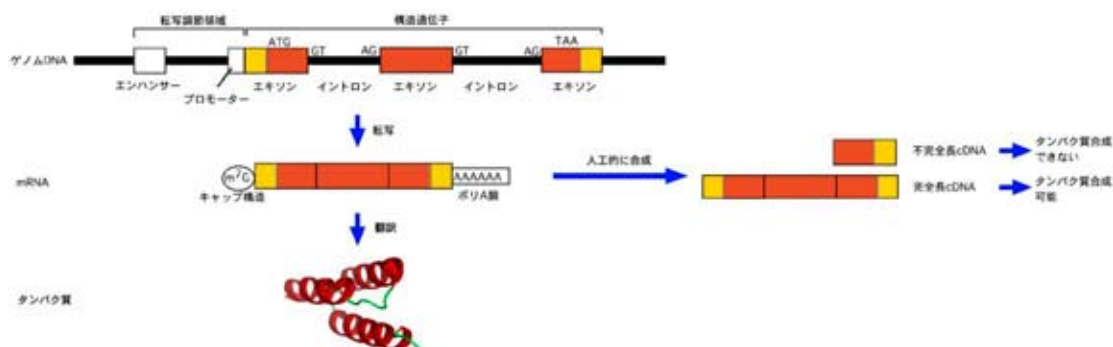


図1 ゲノム DNA と遺伝子・mRNA・タンパク質と cDNA との関係。

ゲノム DNA からは、不要な配列が取り除かれてタンパク質をコードする配列のみに整理された mRNA が転写されます。mRNA から人工的に合成する cDNA のうち、完全長 cDNA は、断片 cDNA と異なり、タンパク質合成に必要な全ての情報を保持しています。完全長 cDNA は、遺伝子の機能解析や組換え体の作出にとって有用なバイオリソース（生物資源）です。

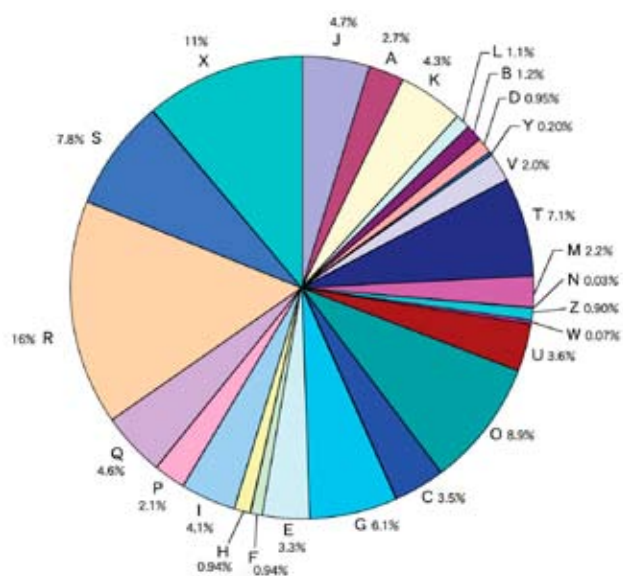


図2 スギで発現している遺伝子の機能分類

スギ雄花で発現している遺伝子をそれぞれの塩基配列がコードするタンパク質の機能によって分類しました。

J: タンパク質の翻訳、A: RNA のプロセッシングと修飾、K: 転写、L: DNA の複製・組換え・修飾、B: クロマチンの構造変換、D: 細胞周期・細胞分裂の制御、Y: 核構造、V: 防御機構、T: シグナル伝達、M: 細胞壁・細胞膜の合成、N: 細胞運動、Z: 細胞骨格、W: 細胞外構造、U: 細胞内輸送・分泌、O: タンパク質の翻訳後修飾・代謝、C: エネルギー生産・変換、G: 炭水化物の輸送・代謝、E: アミノ酸の輸送・代謝、F: 核酸の輸送・代謝、H: 補酵素の輸送・代謝、I: 脂質の輸送・代謝、P: 無機イオンの輸送・代謝、Q: 二次代謝成分の合成・輸送、R: S・X: 不明

表1 スギ遺伝子と相同性を示した既知の花粉アレルゲン

相同性を示したアレルゲン	生物種	相同性を示したスギの遺伝子数
Cry j 1	スギ	6
Cry j 2	スギ	10
Cry j 3.8	スギ	16
CJP-4	スギ	4
CJP-6	スギ	7
Jun o 4	ビャクシン	16
Amb a 3	ブタクサ	2
Cat r 1	ニチニチソウ	10
Che a 1	シロザ	1
Cor a 1.04	セイヨウハシバミ	1
Cor a 10	セイヨウハシバミ	10
Cro s 1	サフラン	3
Cyn d 22	ギョウギシバ	1
Cyn d 24	ギョウギシバ	3
Hum j Profilin	カナムグラ	3
Hum j 1	カナムグラ	3
Lol p 1	ホソムギ	11
Ole e 5	オリーブ	5
Ole e 9	オリーブ	10
Ole e 10	オリーブ	3
Sal k 1.03	ノハラヒジキ	2
Sal k 2	ノハラヒジキ	53

心材成分生成時にスギの辺材で発現する 遺伝子を大量に収集しました

生物工学研究領域 吉田和正、西口 満、二村典宏、楠城時彦

スギの木部には、心材色や病害防御に関わるノルリグナンという成分が含まれますが、それらが作られる過程は不明です。そこで、ノルリグナンを作る酵素遺伝子を探すために辺材で働いている遺伝子を収集しました。収集した1,050個の遺伝子を解析した結果、木材成分の生合成に関係すると推定される16種類の酵素遺伝子を見つけました。これらの遺伝子の中にノルリグナンの生合成に関与する酵素遺伝子が含まれる可能性があります。さらに、樹木を環境ストレスや病虫害から守る働きをしていると予想される遺伝子も多数見つかりました。今回収集した遺伝子は、ノルリグナンの生合成経路や樹木の防御機構の解明に役立つと考えられます。

研究の背景と目的

スギ科やヒノキ科樹木の木部には、ノルリグナンと呼ばれる抽出成分が含まれていますが、それらの生合成酵素は特定されていません。そこで、ノルリグナンの生合成経路を明らかにするため、ノルリグナンの生合成に関わる酵素の候補遺伝子を探しました。

ノルリグナンとは？

ノルリグナンの中には、心材色素の前駆物質と推定されているものや、傷害を受けた辺材で生成し抗菌性をもつものがあります。材色や樹木の耐病性の向上にノルリグナンの利用が考えられますが、そのためには生合成酵素や生合成経路を知る必要があります。

樹木のノルリグナン生合成機構の解明が遅れている理由として、ノルリグナンが幹や枝の内部（木部）で作られること、そして木部からの酵素タンパク質の抽出・精製が難しいことが挙げられます。ところで、スギを伐採し丸太を室内に放置すると、日数の経過とともに辺材中にノルリグナンが生成します。本研究では、この現象に着目し、伐採直後の辺材とノルリグナンを生成している辺材で働いている遺伝子を比較することによって、ノルリグナンの生合成に関連する酵素の候補遺伝子を探せると考えました。

スギ辺材からの遺伝子の大量収集とノルリグナンの生合成に関連する遺伝子の選別

スギを伐採し丸太を室内に置いておくと、その辺材中にノルリグナンの一種アガサレジノールが生成し、その量は40日後に最多となることを確認しました（図1）。そこで、40日後の辺材で特徴的に働いている遺伝子を収集しました。収集した1,050個の遺伝子は、塩基配列が同じものをまとめて504個に整理されました。機能が推定できた263個の遺伝子を分類すると、もっとも多かったのは代謝に関連するものでした（図2）。この中から、遺伝子の発現解析により、ノルリグナンの生合成に関与する可能性のある5種類の酵素遺伝子を選別しました。さらに、樹木を環境ストレスや病虫害から守る働きをしていると予想される生体防御に関連する遺伝子が多数見つかりました。

今回収集した遺伝子は、ノルリグナンの生合成経路やスギの生体防御機構の解明に役立つだけでなく、遺伝子組換えによる樹木の耐病性や環境ストレス耐性の向上に利用できます。

本研究は、科学研究費補助金「スギ木部発現遺伝子の大量解析によるノルリグナン生合成酵素遺伝子の単離」によるものです。

詳しくはYoshida et al. (2007) Tree Physiology 27: 1-9 及びYoshida et al. (2006) Journal of Wood Science 52: 372-375 をご覧下さい。

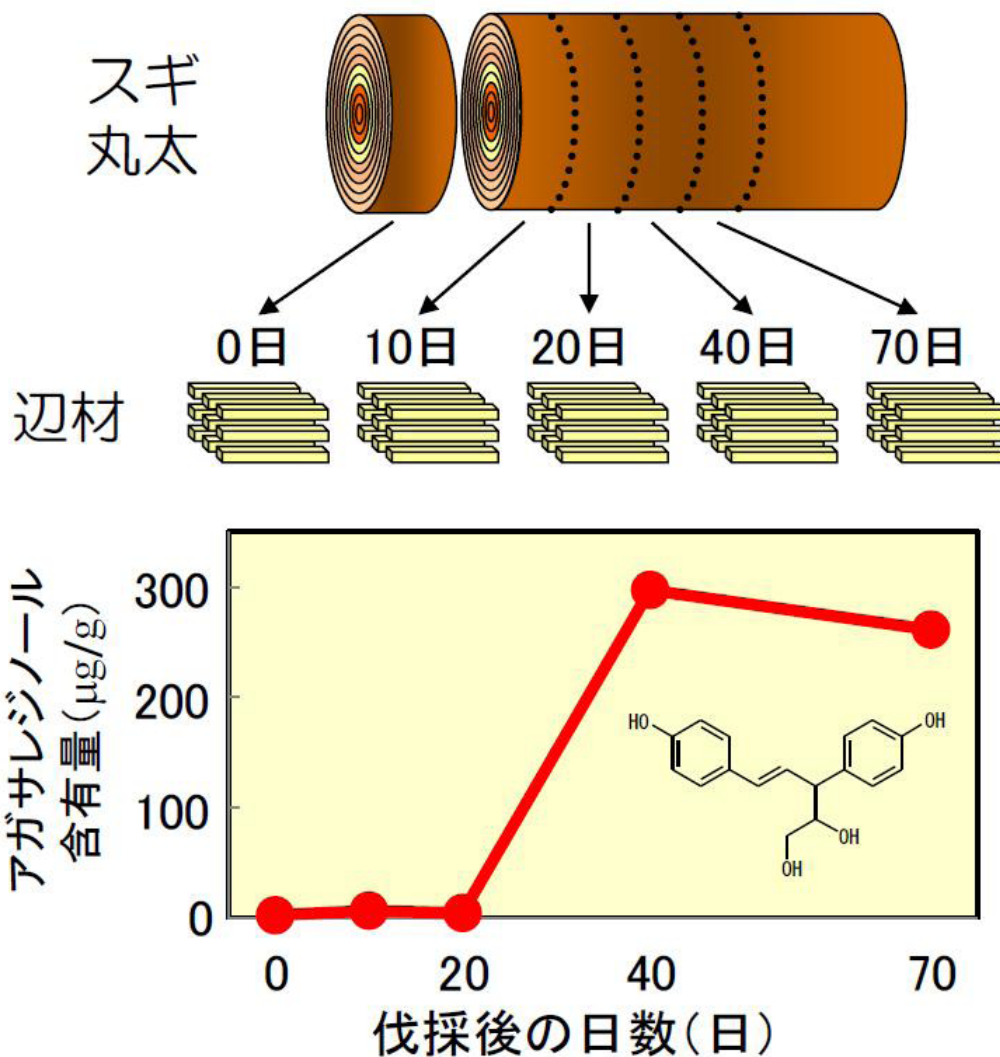


図1 スギ丸太の辺材中のアガサレジノール量の変化

伐採したスギの丸太を室内に置き、伐採当日(0日)、10日後、20日後、40日後、70日後にそれぞれ辺材を採取して、含まれるアガサレジノールの量を調べました。グラフの中の構造式はアガサレジノールを示しています。

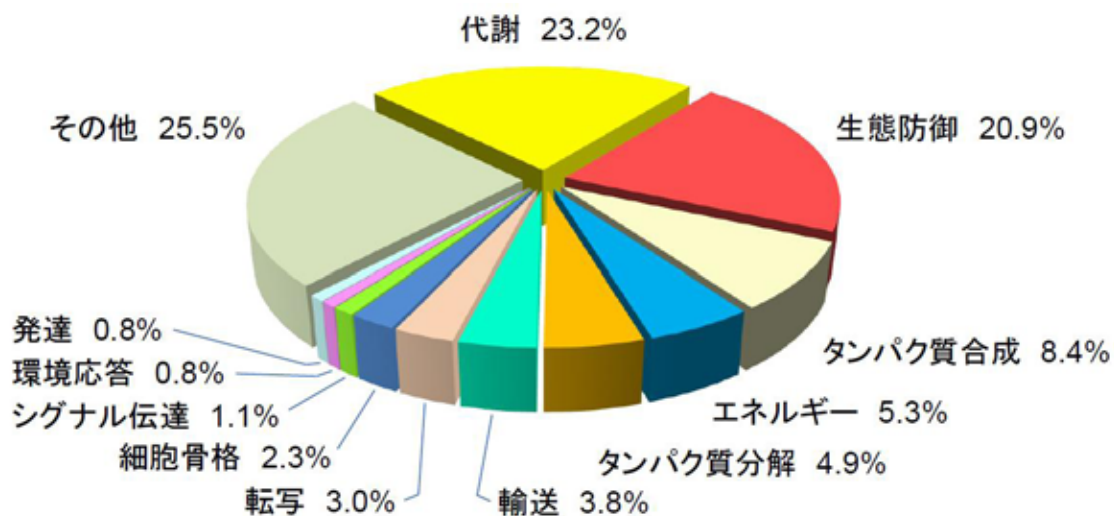


図2 アガサレジノール生成時(40日後)のスギ辺材で優勢に発現している遺伝子の機能分類塩基配列から推定される機能にもとづいて263個の遺伝子を分類しました。

次世代シーケンサーによるシイタケゲノムの解読をしました

きのこ・微生物研究領域
東京工業大学
きのこ・微生物研究領域

宮崎安将
金子真也
村田 仁、高野麻理子、中村雅哉、馬場崎勝彦

この一世紀、日本は先頭に立って世界のシイタケ市場の開拓、品種や生産技術の開発を行ってきました。生産のグローバル化は、これまでに増して、生産現場の問題に即応する品種や将来展望を持つ戦略的な品種の開発を求めています。品種開発では遺伝情報の利用が重要ですが、栽培きのこでは利用出来ませんでした。そこで、遺伝情報を大規模に効率良く収集するため、次世代シーケンサーとスーパーコンピューターを用いてシイタケのゲノム解読を行いました。得られた情報はゲノムのほぼ全域をカバーすると同時に、未知の遺伝子情報を多数含んでいました。本成果は、シイタケの新たな品種開発を始め、食の安全性を図るための科学的根拠に基づく産地判別に必要なDNAマーカーの開発などで役立ちます。

研究の背景と目的

この一世紀、日本は先頭に立って世界のシイタケ市場の開拓、品種や生産技術の開発を行ってきました。世界市場でのシイタケの商品価値の向上は、日本に富をもたらす一方で、シイタケ生産のグローバル化を推進することになりました。その結果、近年では輸入シイタケの増大等の問題を生み、日本のシイタケ産業を苦しめる原因にもなっています。生産者等からは、生産現場の問題に即応する品種や将来展望を持つ戦略的な品種の開発が要望されています。一方、品種開発では新たな特性や市場価値を高めるために、遺伝情報の利用が重要ですが、栽培きのこでは利用出来る情報が殆どありません。そこで、大規模に遺伝情報の収集が可能なゲノム解読を行いました。

シイタケのゲノム解読

ゲノム解読とは、ゲノム上のDNAの塩基配列情報を明らかにすることです。試料は、日本を代表する栽培品種の一つ秋山 A567 号から調製しました（図1）。解読は、技術進歩と効率を踏まえ、次世代シーケンサーとスーパーコンピューター（東京工業大学）を用いて行いました（図2）。シイタケゲノムは約 3,500 万対の DNA の塩基配列からできており、得られた情報はゲノムのほぼ全域をカバーしていました。また、栽培きのこヒラタケ

（2009 年公開）の全ゲノム情報と比較すると、ヒラタケの約 8,500 種の遺伝子と同等の機能を持つと考えられる遺伝子（相同遺伝子）がシイタケに存在することや、多数の未知の遺伝子情報を含むことなどが明らかにできました（表1）。さらに、公開されているシイタケの発現遺伝子の情報の 97.2% に当たる 20,076 種の DNA 塩基配列は、本解読情報に含まれていました。その結果に基づき、より完全な発現遺伝子情報を収集できました。

品種開発や品種判別等に利用できる情報を収集

子実体形成に関わる遺伝子の情報は品種開発では特に重要です。本解読により、新たに、子実体形成の誘導期に発現している 341 種の遺伝子の情報を得ることができました。また、シイタケの品種判別用の DNA マーカー情報が約 50 種公開されていますが、それらの本ゲノム上での位置情報等も明らかにできました。

本成果は、基礎から応用まで幅広い分野での利用が考えられますが、品種開発をはじめ、食の安全性を図るための科学的根拠に基づく産地判別に必要なDNAマーカーの開発などで役立つと考えています。

本研究は、実行課題「きのこ類の生理生態学的解明」で行いました。



図1 解読したシイタケ品種

表1. 公開されているきのこの全ゲノム情報に対するシイタケの相同遺伝子の検索

種名	和名	全遺伝子数	相同遺伝子数(%)
<i>Coprinopsis cinerea</i>	ネナガノヒトヨタケ	13,394	8,209 (61.3)
<i>Laccaria bicolor</i>	オオキツネタケ	20,614	11,149 (54.1)
<i>Schizophyllum commune</i>	スエヒロタケ	13,208	8,625 (65.4)
<i>Pleurotus ostreatus</i>	ヒラタケ	11,603	8,516 (73.4)
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	(和名なし)	10,048	7,459 (74.2)
<i>Tremella mesenterica</i>	コガネニカワタケ	8,313	4,271 (51.4)

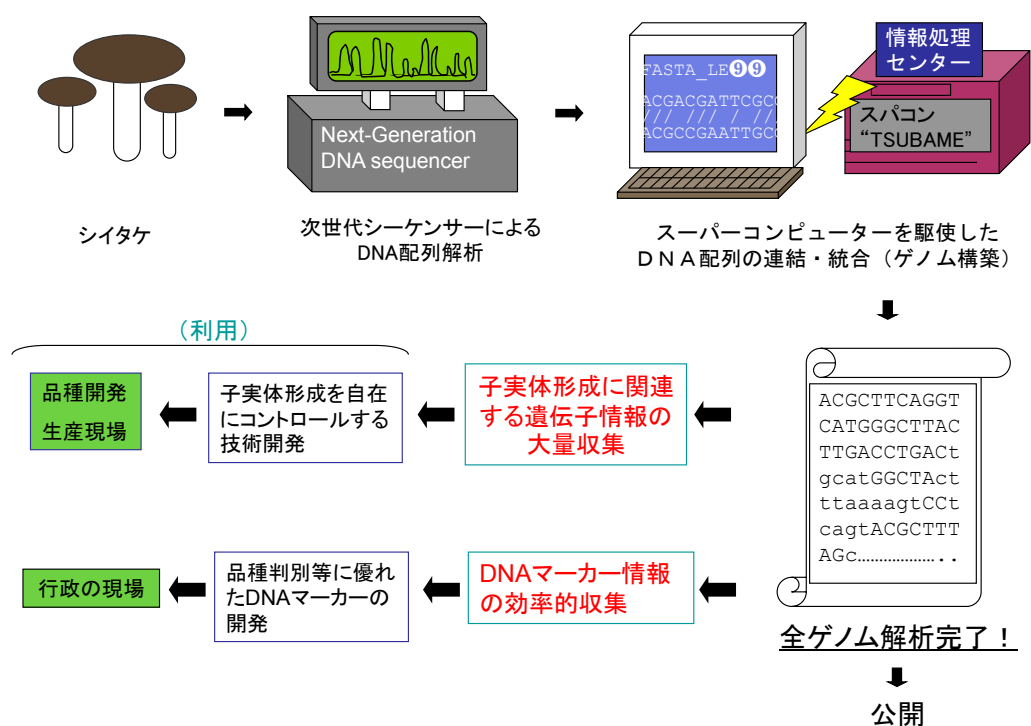


図2. シイタケゲノムの解読とその利用

放射線は樹木にどのような影響を及ぼすのか明らかにしました

生物工学研究領域 西口 満、二村典宏、楠城時彦、吉田和正

放射線は、医療、工業、原子力発電、育種など非常に広い分野で使われています。一方で、過度の放射線は生物に悪影響（放射線障害）を引き起こすことが知られており、放射線を安全に利用するためには、人間だけでなく様々な生物への放射線の影響を調べるのが重要です。そこで、樹木への放射線障害とその防御機構を明らかにすることを目的として、ポプラに放射線を照射した後に生じる様々な異常について調べました。また、放射線照射により様々な遺伝子の発現量が変化することが分かり、樹木は放射線障害を防ぐために遺伝子レベルで放射線に応答することを明らかにしました。

研究の背景と目的

事故等により環境中に大量に放出された放射線は、樹木を含む様々な生物に悪影響を及ぼします。国際放射線防護委員会（ICRP）による2007年勧告においても、環境の放射線防護が新設され、人間以外の生物種について放射線評価の枠組みを開発することが必要とされています。そのため、樹木への放射線影響の解明を目的として研究を始めました。

放射線により生じる様々な異常

ポプラの苗木に放射線の一種であるガンマ線（注1）を照射した後、普通の環境に戻して生育させると、照射後4週目頃から異常な形や色をした葉や茎が現れます（図1）。また、照射したガンマ線量が少ない場合には、ポプラの成長量は非照射のものに比べて変化しませんが、ガンマ線量が多くなると、成長が遅くなる、成長が止まる、あるいは枯れるといった異常が生じました（図2）。さらに、ガンマ線照射によって、ポプラのDNA（注2）が切断され短くなることも明らかにしました（図3）。DNAは遺伝子の本体であり、DNAが傷つくことによって、葉の形や色、成長に異常を引き起こすと推測できます。

放射線から樹木を防御する仕組み

ポプラが枯れる致死ガンマ線量は150～200グレイ（注3）と推定されました。樹木の中では放射線に弱いとされるマツの致死線量は5～39グレイという報告があります。一方で、人間の致死線量は4～7グレイなので、樹木は比較的放射線に強いと考えられます。それでは、樹木は放射線に対してどのような防御手段を持っているのでしょうか？ それを探るため、ポプラの様々な遺伝子の発現量（遺伝子のはたらいている量）を調べました（図4）。その結果、放射線によって傷ついたDNAを修復するタンパク質（DNAリガーゼⅣやRAD17など）や、放射線によって作られた毒性の活性酸素や過酸化物

の消去にかかわるタンパク質（グルタチオン-S-トランスフェラーゼやペルオキシダーゼなど）の遺伝子等、多くの遺伝子の発現量がガンマ線照射後に増加し、活発にはたらくことが分かりました。逆に、サイクリンA1タンパク質の遺伝子などは、ガンマ線照射により発現量が減少しました。本来、サイクリンA1には細胞分裂を進めるはたらきがありますが、ガンマ線によって傷ついたDNAを修復する時間をかせぐために、その遺伝子発現量を減らして細胞分裂を停止させていると考えられます。このようにして、樹木の中では多くの遺伝子の働きが複雑に変化することで、放射線障害を防ぐ仕組みが存在することが明らかになりました。

樹木への放射線の影響とその防御機構を明らかにすることにより、自然環境に放出される放射線の安全規制のための情報提供や、防御遺伝子を利用した様々な環境ストレス耐性樹木の開発につながります。

本研究は、文部科学省原子力試験研究費「放射線による樹木のDNA損傷と修復機構に関する研究」による成果です。

言葉の説明

（注1）ガンマ線 放射性物質の原子核から発生するエネルギーの高い電磁波です。物質をよく透過するので、医療用具の滅菌、がん治療、金属・機械製品の非破壊検査などに使われます。

（注2）DNA デオキシリボ核酸の略で、遺伝子の本体である糸状の化学物質です。ポプラでは、1細胞あたり約10億塩基対（約34cm）の長さになり、その中に45,000種以上の遺伝子が存在すると予想されています。

（注3）グレイ 放射線量の単位で、物質に吸収される放射線のエネルギー量を表します。



図1 ガンマ線照射により生じた葉の形態異常
ポプラの普通葉 (a) と、ガンマ線 (100 グレイ) を照射したポプラで見られる葉の形態異常 (b、c)。

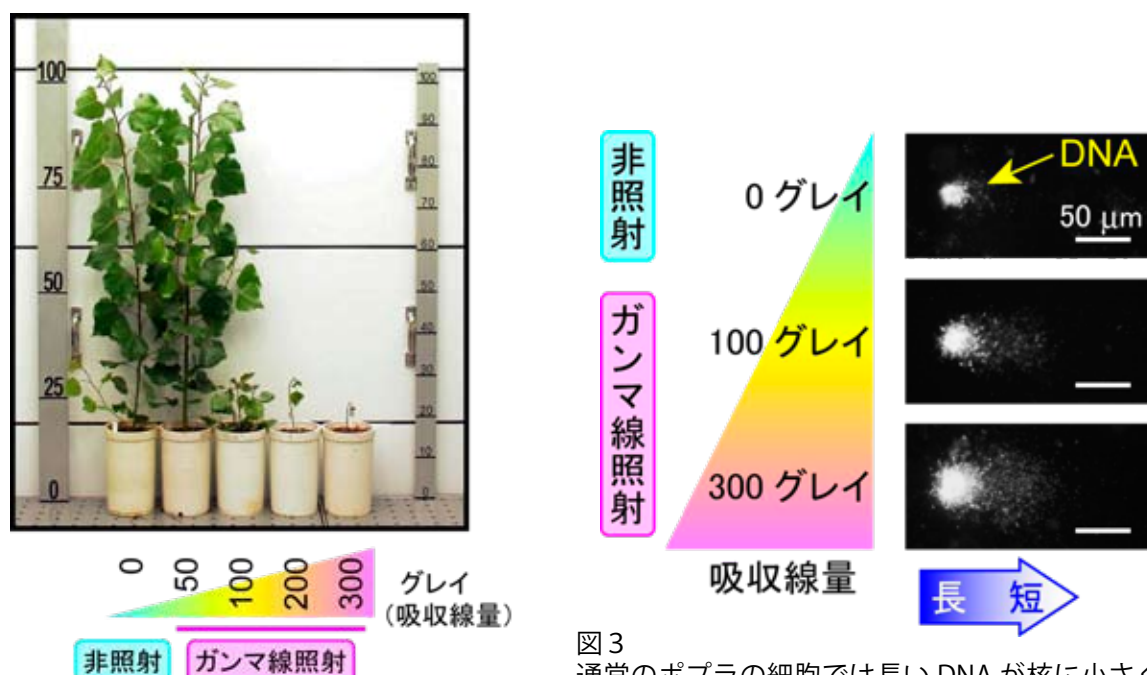


図2 ポプラの成長に及ぼすガンマ線の影響
ガンマ線照射後6週目の様子。100 グレイでは成長が遅くなり、200 グレイ以上では成長せずに枯れてしまいます。

図3
通常のポプラの細胞では長い DNA が核に小さく折りたたまれていることが分かります (上段)。ガンマ線を照射した細胞では DNA が切断され短くなり、核の周囲に分散するようになります (中段、下段)。

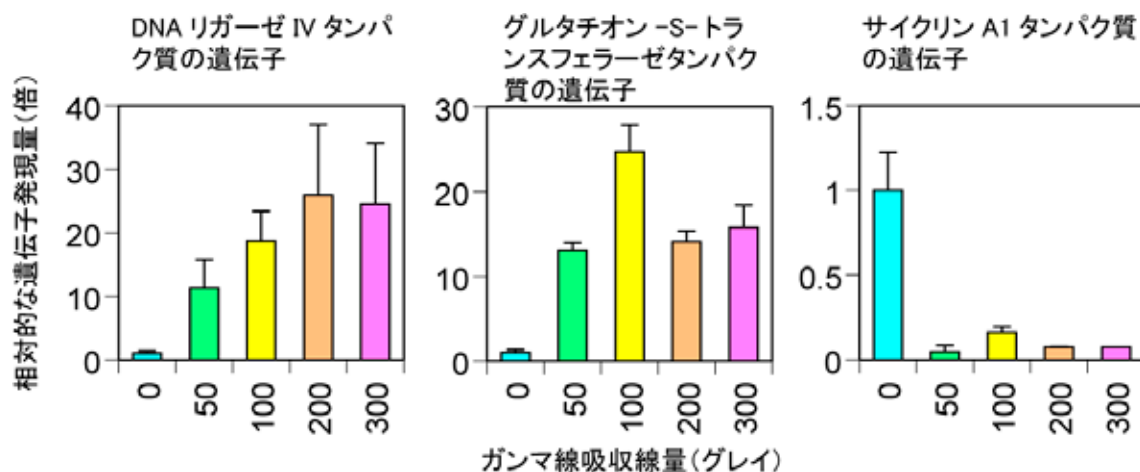


図4 ガンマ線照射終了後のポプラの遺伝子発現量の変化
各遺伝子の発現量は、ガンマ線を照射していないポプラ (0 グレイ) の遺伝子発現量を 1 とした時の相対量で示しています。ガンマ線照射により、遺伝子発現量が増加または減少することが分かります。

オゾン耐性遺伝子組換えポプラは耐乾索性や耐塩性を保持することを明らかにしました

生物工学研究領域
研究コーディネータ

毛利 武、古川原聡
篠原健司

近年、温暖化などによる地球規模での環境破壊が懸念されています。世界の荒漠地（乾燥地や耕作放棄地など）の面積は年々増加し、陸地の約30%に達しています。緑化による荒漠地の環境修復のために、高環境ストレス耐性を保持したスーパー樹木の開発が期待されています。本研究では、環境保全に貢献するスーパー樹木の開発を目指して、大気汚染で問題とされる高濃度のオゾンに耐性を示す遺伝子組換えポプラを作出しました。また、この組換えポプラが耐乾索性や耐塩性などの他の環境ストレス耐性を保持することを明らかにしました。ここで開発した遺伝子組換え技術は、種々の環境ストレスに対応可能なスーパー樹木の開発に役立ちます。

研究の背景と目的

硫酸化物やオゾンによる大気汚染は深刻な社会問題となっており、一部の地域では森林衰退との関係も指摘されています。植物は気孔から大気汚染ガスを取り込み、解毒することができますが、大気汚染ガスの濃度が高い場合には植物自身に傷害が生じ、落葉したり、枯死したりします。本研究では、遺伝子組換えによってポプラのオゾン耐性を高めることを目的としました。また、得られた組換えポプラが、他の環境ストレスに対しても耐性を向上しているかを調べました。

オゾン耐性遺伝子組換えポプラの作出

高濃度のオゾンによって引き起こされる葉の傷害はストレス誘導性のエチレン合成に起因していると考えられます。本研究では、エチレン合成酵素遺伝子の発現抑制によってエチレン合成を阻害した遺伝子組換えポプラを作出しました（図1）。この組換えポプラはオゾン耐性を示し、高濃度オゾンの曝露によっても葉の傷害が生じませんでした。反対に、エチレン合成を促進する組換えポプラを作出したところ、こちらはオゾン感受性を示し、比較的低い濃度のオゾン曝露に対しても葉の傷害が観察できました。これらの技術を応用することで、大気汚染に強い緑化木や大気汚染を感知する環境指標樹木の開発が期待できます。

耐乾索性と耐塩性の評価

特定の環境ストレスに対する耐性を向上させるために適用した遺伝子組換え技術は、他の環境ストレス耐性にも影響を及ぼす可能性があります。組換え樹木の有用性

を議論するためには、複数の環境ストレスに対する耐性を評価する必要があります。本研究では、オゾン耐性組換えポプラの乾燥ストレスと塩ストレスに対する応答を解析しました。

野生型ポプラへの水供給を停止し、乾燥ストレスを与えると、葉はしおれ始めてまもなく褐変化し、徐々に枯死に至りますが、組換えポプラではその進行が抑えられることが明らかになりました（図2）。また、根から大量の塩化ナトリウムを吸収させ高塩ストレスを与えた場合にも、同様に葉がしおれて褐変化しますが、やはり組換えポプラではこのような傷害が緩和されました（図3）。どちらの環境ストレスも野生型ポプラにおいてエチレン合成を誘導しましたが、オゾン耐性組換えポプラではエチレン合成は抑制されました。

以上のことから、環境ストレスによる葉の傷害発生過程にエチレン合成が深く関与し、エチレン合成を抑制することで環境ストレス耐性を付与することができると説明できます。また、エチレン合成を抑制するために適用した遺伝子組換え技術は、オゾン耐性だけではなく、耐乾索性や耐塩性を高める方法としても有効であることが明らかになりました。本研究で作出した組換えポプラは、複合的なストレスが存在する環境にも対応できると考えられ、適用範囲の広いスーパー樹木の創出につながると期待できます。

本研究は、森林総合研究所交付金プロジェクト「環境保全に貢献するスーパー樹木の創出に向けた基盤技術開発」の成果です。

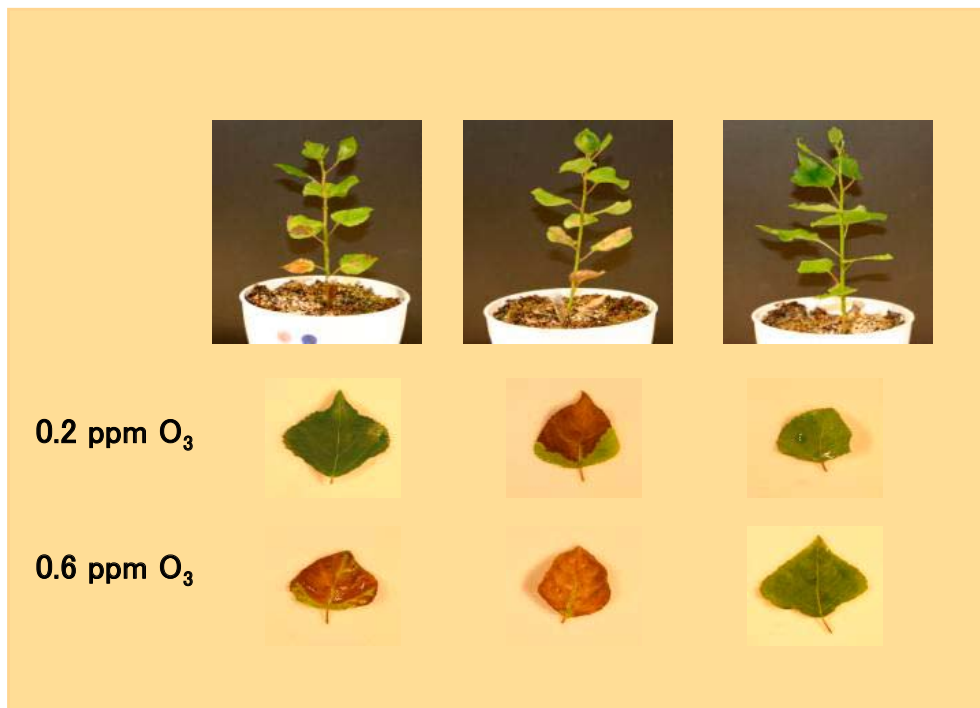


図1 オゾン耐性遺伝子組換えポプラの作出
 左列:野生型ポプラ。中央列:エチレン合成酵素遺伝子を過剰発現させた組換えポプラ。
 右列:同じ遺伝子の発現を抑制した組換えポプラ。エチレン合成を抑制したポプラは
 強いオゾン耐性を、逆にエチレン合成を促進したポプラは、強い感受性を示します。



野生型
ポプラ

組換え
ポプラ

図2 乾燥ストレスに対する応答
 水の供給を停止すると、葉はしおれて間もなく
 褐変が進み、下部の葉から枯れ落ちていきま
 す。エチレン合成を抑制した組換えポプラでは、
 このような褐変と枯死が緩和されます。



野生型ポプラ

組換えポプラ

図3 塩ストレスに対する応答
 根から大量の塩化ナトリウムを吸収させた野生型ポ
 プラは数日以内に枯死します。エチレン合成を抑制し
 た組換えポプラでは、この期間内に葉が枯れないだ
 けではなく、光合成活性も維持します。

ポプラの成長を制御することに成功しました

生物工学研究領域
研究コーディネータ

伊ヶ崎知弘
篠原健司

樹木は、多年生で長期間にわたり成長し炭酸ガスを固定することができます。有用形質を持つ樹木の成長速度を変えることができれば、成長を早くしたものは地球温暖化対策として森林の衰退した地域での植林やバイオマス生産を目的とした植林に、成長を遅くしたものは、セダムや芝と同程度の育成条件での屋上緑化等の都市緑化に利用できます。樹木の成長の制御には、成長の調節が起こるメカニズムを知る必要があります。そこで、モデル実験樹木として研究が進められているポプラから成長に関わる植物ホルモンの一つとして知られている活性型ジベレリンの合成酵素遺伝子や代謝酵素遺伝子を単離しました。そして、遺伝子組換え技術を用いて代謝酵素遺伝子を制御することで、活性型ジベレリンを不活性型にしたり、活性型ジベレリンの前駆体を活性型に向かないように変化させたりすることが可能となり、ポプラの成長を抑制することに成功しました。

研究の背景と目的

植物の成長を主に制御している因子として、植物ホルモンのジベレリンが知られています。そこで、私たちはポプラの成長に関しても、ジベレリンが大きく関与しているであろうと予測し、既知の植物の情報をもとに、ポプラからジベレリン合成酵素遺伝子や代謝酵素遺伝子を探しました。

樹木の成長を制御する遺伝子の単離と機能の解析

ポプラから、15個の活性型ジベレリン合成酵素遺伝子と13個のジベレリン代謝酵素遺伝子を見つけました(図1)。それらの遺伝子を系統的に解析したところ、合成酵素遺伝子も代謝酵素遺伝子もそれぞれ大きく3種類のグループに分類されることが判明しました(図1)。さらに、それぞれの遺伝子がポプラのどの器官や組織で働いているのか、またシロイヌナズナで働かせた場合に成長にどのような影響を及ぼすのかを調べました。その結果、多くの遺伝子はそれぞれが器官や組織特異的に発現していること、それぞれの代謝酵素を大量に作るように組換えたシロイヌナズナは顕著に成長が抑制されることがわかりました。しかし、これらの組換えシロイヌナズナは外から活性型のジベレリン A_3 を与えると成長量

が回復し、正常に種子を生産しました。

ジベレリン代謝酵素遺伝子を利用した成長抑制ポプラの作出

ジベレリン代謝酵素 *PnGA2ox1* を大量に作るようにポプラを改変することで、ポプラの成長量を減少させることができるのではないかと考え、遺伝子組換え技術を用いて組換えポプラを作出しました。*PnGA2ox1* を大量に作る組換えポプラは、成長量が約40%に減少していましたが(図2)、活性型のジベレリン A_3 を与えると、成長量が回復しました。また、ジベレリン合成酵素遺伝子や代謝酵素遺伝子の発現量を測定したところ、合成酵素遺伝子の発現が顕著に増加しており、遺伝子組換えにより *PnGA2ox1* の発現量が増加した影響を緩和していることが推測できました。今後、この成果を利用し、樹木を植栽する場所に適した成長量に制御する技術の研究開発を進めます。

本研究は、独立行政法人森林総合研究所交付金プロジェクト「環境保全に貢献するスーパー樹木の創出に向けた基盤技術開発」による成果です。

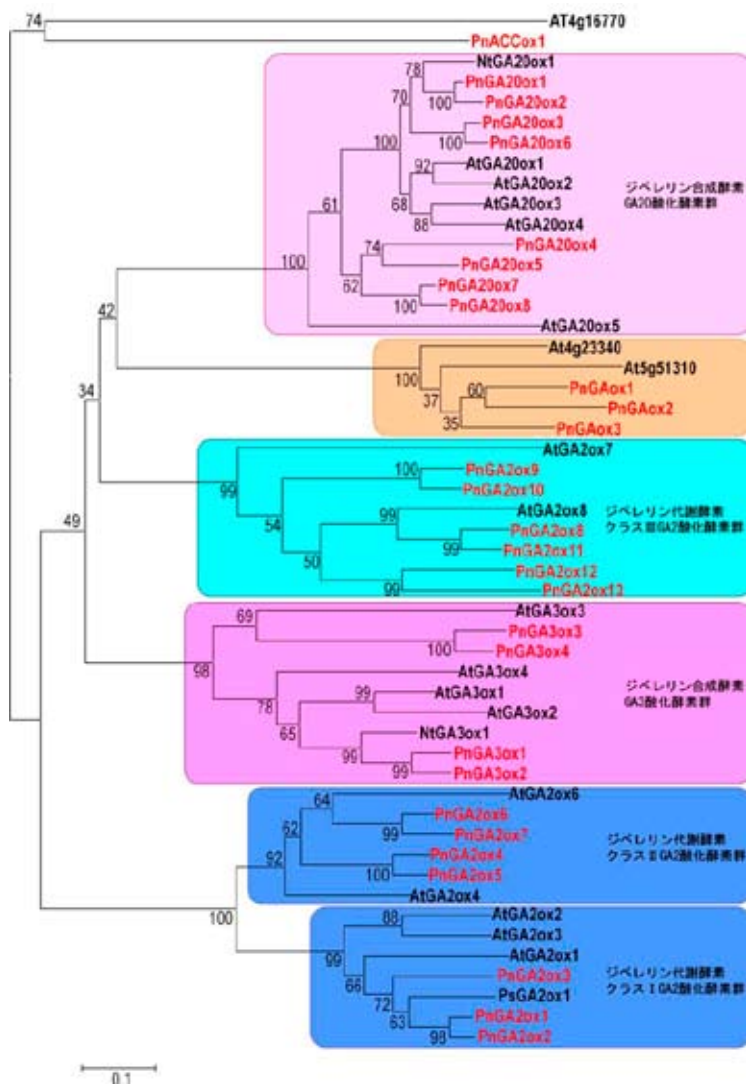


図1 ポプラのジベレリン合成酵素遺伝子及び代謝酵素遺伝子の系統学的解析

シロイヌナズナ、タバコ及びエンドウの遺伝子とポプラから単離した遺伝子(赤文字)を比較しました。赤系の枠内及び青系の枠内の遺伝子は、それぞれ、ジベレリン合成酵素及び代謝酵素遺伝子を示します。

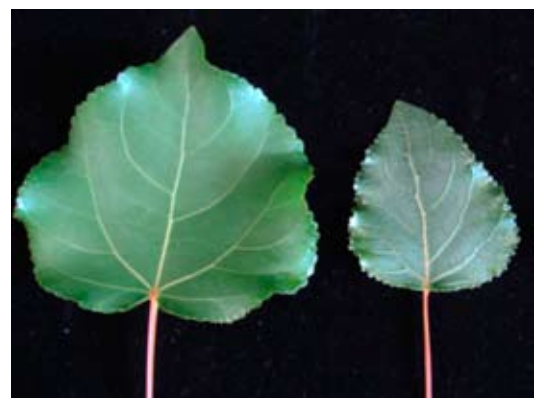


図2 ジベレリン代謝酵素遺伝子を用いたポプラの成長制御

PnGA20ox1 を大量に発現する組換えポプラ(写真右)と野生型ポプラ(写真左)。組換えポプラでは葉も小さい(下段写真)。

ポプラの着花を制御することに成功しました

生物工学研究領域 伊ヶ崎知弘、西口 満

樹木は、種を播いてから初めて開花・結実するまでに数年から数十年の長い時間を必要とし、効率的に育種することが困難です。また、一度着花するようになると、毎年大量の花をつけ、スギのように花粉症を引き起こす樹種もあります。樹木の育種年限の短縮や花粉発生の抑制には、樹木の花芽形成（花成）が起こるメカニズムを知る必要があります。そこで、モデル実験樹木のポプラから花成を誘導する役割を持つ遺伝子や抑制する役割を持つ遺伝子を単離し、遺伝子組換え技術を用いてそれらの遺伝子を制御することで、ポプラの花成を自在に制御することに成功しました。この結果は、商業植林を視野に入れた遺伝子組換え樹木の実用化に役立ちます。

研究の背景と目的

シロイヌナズナというモデル実験植物では、花成制御メカニズムの解明が進んでいます。そこで、私たちはポプラにも同様の花成制御メカニズムが存在すると仮定のもと、シロイヌナズナの花成を抑制する TFL1 と花成を促進する FT という構造のよく似た2つの遺伝子に着目し、これらの遺伝子とよく似た構造を持つポプラの遺伝子を探しました。

樹木の花成を制御する遺伝子の単離と機能の解析

ポプラから TFL1 や FT とよく似た構造を持つ9つの遺伝子を見つけ、系統的に解析したところ、2つの遺伝子は TFL1 と同じ遺伝子グループに分類され、また5つの遺伝子は FT と同じ遺伝子グループに分類されることが明らかになりました（図1）。さらに、それぞれの遺伝子がポプラのどの器官や組織で働いているのか、シロイヌナズナで働かせた場合に花成にどのような影響を及ぼすのかを調べました。その結果、PnTFL1 と命名した遺伝子は、ポプラの頂芽や花芽にならない位置の側芽で発現していること（図2）、PnTFL1 を大量に作るように組換えたシロイヌナズナは顕著に花成が抑制されることがわかりました。一方、PnFT1 及び PnFT2 と命名した遺伝子は、花が咲く年齢に達したポプラの花成が起こる時期の葉で強く発現しているが、花が咲く年齢に達してい

ない同じ時期の葉ではあまり発現していないこと（図2）、PnFT1 や PnFT2 を大量に作るように組換えたシロイヌナズナは顕著に花成が促進されることもわかりました。

花成制御遺伝子を利用した早期開花ポプラの作出

花成抑制遺伝子 PnTFL1 を働かなくしたり、花成促進遺伝子 PnFT1 や PnFT2 を大量に作るようにポプラを改変したりすることで、ポプラの開花までの期間を短縮できるのではないかと考え、遺伝子組換え技術を用いて組換えポプラを作出しました。PnTFL1 の働きを抑制したポプラは、鉢出し後または挿し木後1ヶ月～5ヶ月程度で開花しました（図3）。また、PnFT1 を大量に作る組換えポプラも植物ホルモンのジベレリンの合成を阻害する薬剤で処理すると、2ヶ月程度で開花しました（図4）。今後、この成果を利用し、スギをはじめとする樹木の育種の効率化や花粉発生の抑制、生態系での遺伝子攪乱の防止等を目的とした研究を進めます。

本研究は、独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構生物系特定産業技術研究支援センター基礎研究推進事業「果樹等における花成制御技術の開発」による成果です。

詳しくは Igasaki et al. (2008) Plant and Cell Physiology 49: 291-300 をご覧下さい。

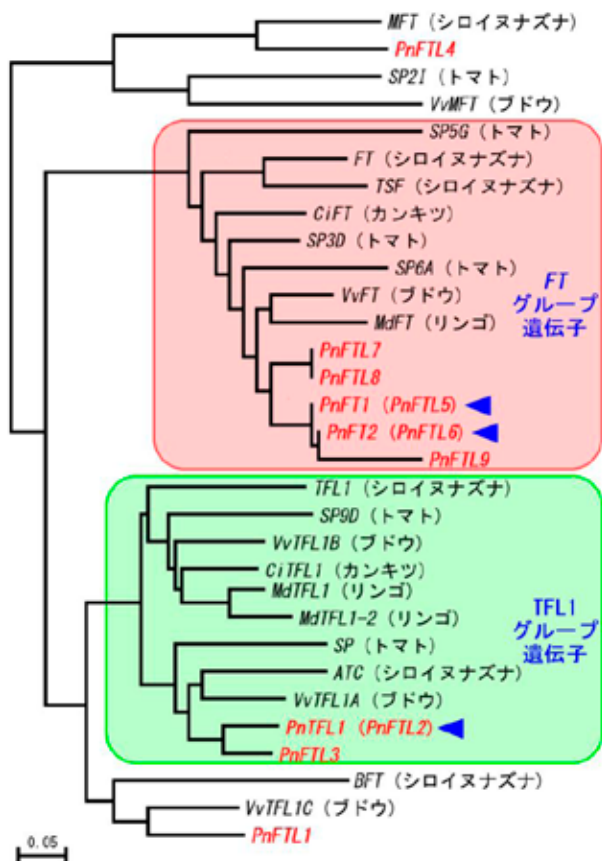


図1 花成制御遺伝子 *TFL1* 及び *FT* とよく似た構造を持つポプラの遺伝子の系統学的解析

シロイヌナズナ、トマト、リンゴ、カンキツ及びブドウの遺伝子とポプラから単離した遺伝子(赤文字)を比較しました。青矢頭はポプラの花成に参与していることが示唆された遺伝子を示します。赤枠内及び緑枠内の遺伝子は、それぞれ、*FT* グループ遺伝子及び *TFL1* グループ遺伝子を示します。



図3 花成抑制遺伝子 *PnTFL1* の発現を抑制した組換えポプラの開花



図4 花成促進遺伝子 *PnFT1* を過剰に発現する組換えポプラの開花(薬剤処理との併用で開花を促進させました)

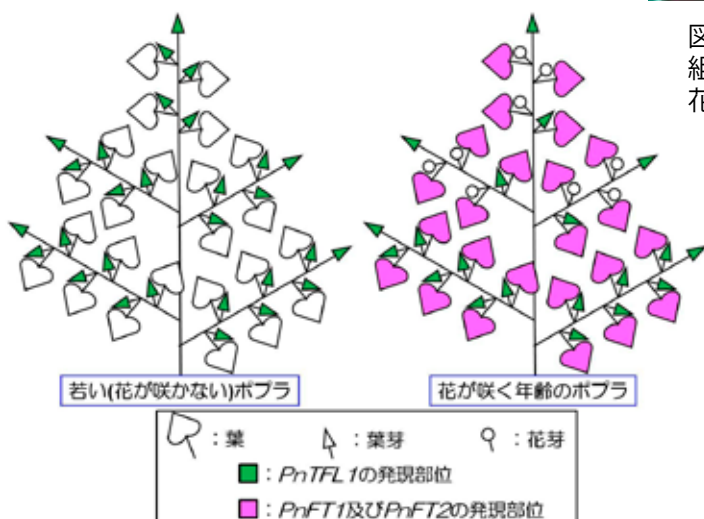


図2 花成時期のポプラにおける *PnTFL1*、*PnFT1* 及び *PnFT2* の発現部位の模式図

スギ花成制御遺伝子の単離と機能解析に成功しました

生物工学研究領域
研究コーディネータ

二村典宏、片畑伸一郎
篠原健司

近年、わが国ではスギ花粉症患者が急増し、深刻な社会問題となっています。スギ花粉症対策の一つとして、スギの雄花形成に関係する遺伝子の働きを制御した遺伝子組換えスギの開発が進められています。スギの花粉発生を抑制する遺伝子組換え技術を開発するためには、どのような仕組みでスギの花が形成されるのかを理解する必要があります。

本研究では、スギの花芽形成（以後、花成と略します）に関連する遺伝子群を単離し、それらの遺伝子の役割について調べました。その結果、スギの花成を制御している2つの遺伝子を特定することができました。本研究で得られた成果は、スギ雄花形成の制御による花粉発生抑制技術の開発に役立つと考えられます。

研究の背景と目的

スギ花粉症は1964年に日光市で初めて報告され、現在では国民の25%以上が発症しているとも言われています。花粉発生源を減少させる取り組みとして、雄性不稔スギ（無花粉スギ）の育種や、スギ雄花形成を抑制する遺伝子組換え技術の開発が進められています。こうした取り組みをさらに進展させるためには、スギの花成メカニズムを明らかにする必要があります。

本研究では、花成に関連する遺伝子群を単離し、それらの遺伝子の役割について調べました。

スギの花成に関わる候補遺伝子の単離

モデル実験植物であるシロイヌナズナ等では、花成メカニズムの解明が進んでいます。とりわけ、MADS-box 遺伝子と呼ばれるグループは、花成をはじめとする様々な発達過程に関わる遺伝子として知られています。一方、スギなどの裸子植物では花成に関わる遺伝子の存在やその役割についてほとんど分かっていません。そこで、10,463種類のスギ雄花完全長 cDNA から MADS-box 遺伝子とよく似た構造を持つ遺伝子を探索しました。その結果、12個のスギ MADS-box 遺伝子を単離することができました。

単離したスギ MADS-box 遺伝子が花成制御に関わるかを短期間で検証するため、これらのスギ遺伝子を過剰発現させた遺伝子組換えシロイヌナズナを作出しました。その結果、シロイヌナズナの花成を促進させる2種類のスギ遺伝子を明らかにしました（図1）。系統解析という手法によりこれらの遺伝子を分類したところ、一つは *SOC1* のグループに属する遺伝子、もう一つは *AP1/SEP* のグループに属する遺伝子であったことから、それぞれ *CjSOC1* 遺伝子と *CjAP1/SEP* 遺伝子と名付けました（図2）。

スギの花成に関わる遺伝子の特徴

次に、この2種類の遺伝子がスギのどの器官で働いているのかを調べました（図3）。*CjSOC1* 遺伝子は花粉以外の全ての器官で発現している一方、*CjAP1/SEP* 遺伝子は主に花で発現していることが分かりました。さらに、スギの花成とこの2種類の遺伝子の発現時期の関係について調べました。スギは通常、種を播いてから開花するまで10年～20年程度かかるといわれていますが、ジベレリンという植物ホルモンを散布すると苗木でも開花させることができます。6年生のスギ苗木にジベレリンによる花成誘導をおこない、その後の遺伝子発現の経時変化を調べた結果、*CjSOC1* 遺伝子の発現はジベレリン処理後1週間で上昇するのに対し、*CjAP1/SEP* 遺伝子の発現はさらに1ヶ月後の雄花が肉眼で観察される頃に上昇していました。以上の結果から、*CjSOC1* 遺伝子は花芽分化の初期に働く遺伝子、*CjAP1/SEP* 遺伝子は *CjSOC1* 遺伝子の後で花芽分化や花の形態形成に関わる遺伝子であると考えられます。

遺伝子組換え技術を用いてスギの花粉発生を抑制する方法の一つは、スギの花成に関わる遺伝子の働きを抑えることにより開花を制御することです。花粉が飛散しなければ、組換え技術により導入した遺伝子の拡散も抑えられます。スギの花成に関わる遺伝子の発見は、このような遺伝子組換えスギの開発にもつながります。

本研究は、林野庁事業「遺伝子組換えによる花粉発生制御技術の開発事業」による成果です。

成果の一部は Futamura et al. (2008) BMC Genomics 9: 383 をご覧下さい。

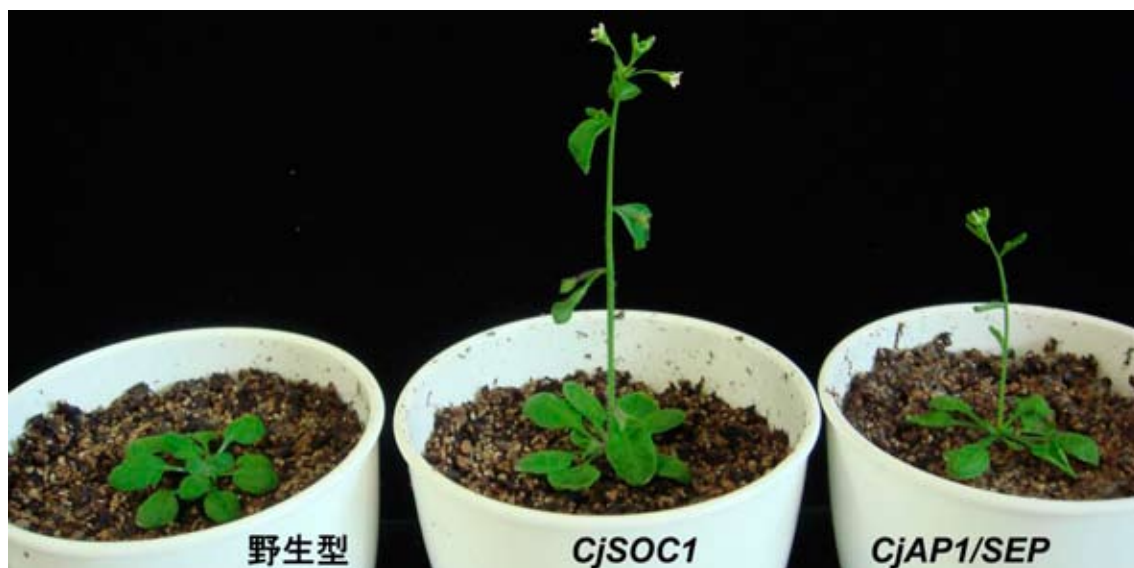


図1 スギ MADS-box 遺伝子を過剰に発現させたシロイヌナズナの開花
野生型では花芽形成が始まっていない時期（播種20日後）に、組換え体では開花しています。

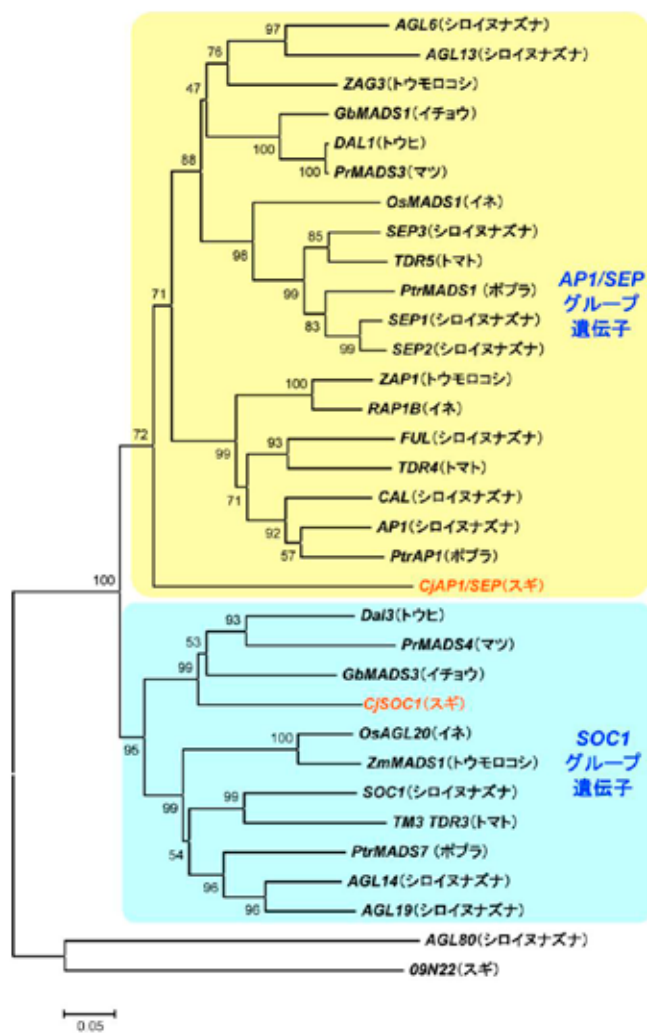


図2 *CjAP1/SEP1* 遺伝子と *CjSOC1* 遺伝子によく似た構造を持つ MADS-box 遺伝子の系統解析
スギから単離した MADS-box 遺伝子（赤文字）を類似の遺伝子と比較しました。黄枠内及び青枠内の遺伝子は、*AP1/SEP1* 遺伝子グループ及び *SOC1* 遺伝子グループを示します。

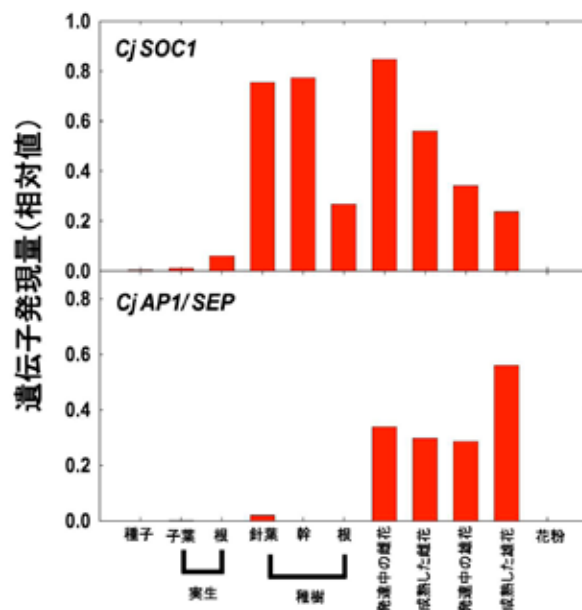


図3 *CjSOC1* 遺伝子と *CjAP1/SEP1* 遺伝子の各器官での遺伝子発現特性
CjSOC1 遺伝子は花粉以外の全ての器官で発現しています。一方、*CjAP1/SEP1* 遺伝子は針葉でもわずかに発現していますが、花での発現量が多いことが分かりました。

きのこの子実体形成に関連する遺伝子を特定しました

きのこ・微生物研究領域

宮崎安将

我が国のきのこの生産額は林業総生産額の過半を占めるまでになっていますが、さらなる消費の拡大につながる新品種の開発が求められています。きのこの品種開発では、子実体形成に関わる遺伝子や、そのメカニズムに対する情報が必要となります。そこで、シイタケを中心に、子実体形成の誘導、分化に必要な光刺激の受容や応答に関わる遺伝子や、子実体の姿勢制御に関わる重力応答性遺伝子、菌糸を束ねて子実体を形作る遺伝子などを特定しました。本成果は、きのこの子実体形成を自在にコントロールし、形などがより市場に好まれるきのこを作出する品種開発の現場で役立ちます。

研究の背景と目的

きのこ生産額は林業総生産額の過半を占めるまでになっていますが、さらなる消費の拡大に向けて新品種の開発が求められています。効率的な品種開発を行う上で、きのこの栽培特性に関わる科学的な知見の収集と活用は重要です。このため、子実体形成に関連する遺伝子やメカニズムの解明を行いました。

シイタケの光受容体遺伝子と光応答性遺伝子

きのこの菌糸の伸長には、光は必要ではありませんが、きのこの生殖器官である子実体の誘導や形成には青系の光が必要です。そこで、シイタケにおいて光を感じとる「きのこの目」となる分子である光受容体の遺伝子 (*phrA* と *phrB*) を特定しました。また、光条件に応答して働く遺伝子 (光応答性遺伝子) として、原基形成期に遺伝子の発現を制御する遺伝子 (*Le.cdc5*, *priB*) などを特定しました。さらに、光と子実体形成の関わりを示すものとして、光応答性遺伝子 *Le.cdc5* と相互作用があるとして単離した遺伝子 (*cipA*, *cipB*) が光応答性遺伝子 *Le.cdc5* と協調して働くことで、これら遺伝子の標的遺伝子 (*ctg1*) を直接制御し、子実体形成に働いていることが分かりました。図1は、これら遺伝子の相互の関わりを表しています。

子実体を形作る遺伝子

子実体は菌糸の集合体ですが、培養菌糸と異なり、菌糸は互いに密着し容易に剥がすことができません。シイタケの子実体形成期に特異的に働く遺伝子として、植物

の細胞接着に関わる遺伝子に類似した遺伝子 (*Le.flp1*) を発見しました。原基及び子実体全体でその発現が見られたことなどから、本遺伝子は子実体の形づくりに必要な菌糸の接着に働くことが考えられました。

重力に応答する遺伝子

きのこは、傘が地面と水平に開く様子に子実体を形成します。これは、きのこの重力応答と考えられます。きのこの重力応答を調べるために、3次元的に回転して疑似無重力を再現する装置を用いてヒラタケを栽培したところ、通常よりも柄が短く、傘が平たい子実体が得られました (図2)。本疑似無重力条件下では、チューブリン、タンパク質分解酵素などの遺伝子の発現量が増加し、ヒストン、レクチン、グリコーゲン合成酵素などの遺伝子は減少するなど、遺伝子が重力に応答して挙動を変えることを発見しました。

きのこの品種開発では、栽培特性、とりわけ、子実体形成に関わる科学的な知見が重要です。本成果は、きのこの子実体形成を自在にコントロールし、形などがより市場に好まれるきのこを作出する品種開発の現場で役立つと考えます。

本研究は、科研費・若手研究B「きのこの子実体形成の分子機構の解析」及び実行課題「きのこ類の生理生態学的解明」で行いました。

詳しくは Miyazaki et al. (2010)FEMS Microbiol Lett 307: 72-79 及び Miyazaki et al. (2007)Curr Genet 51: 367-375 をご覧下さい。

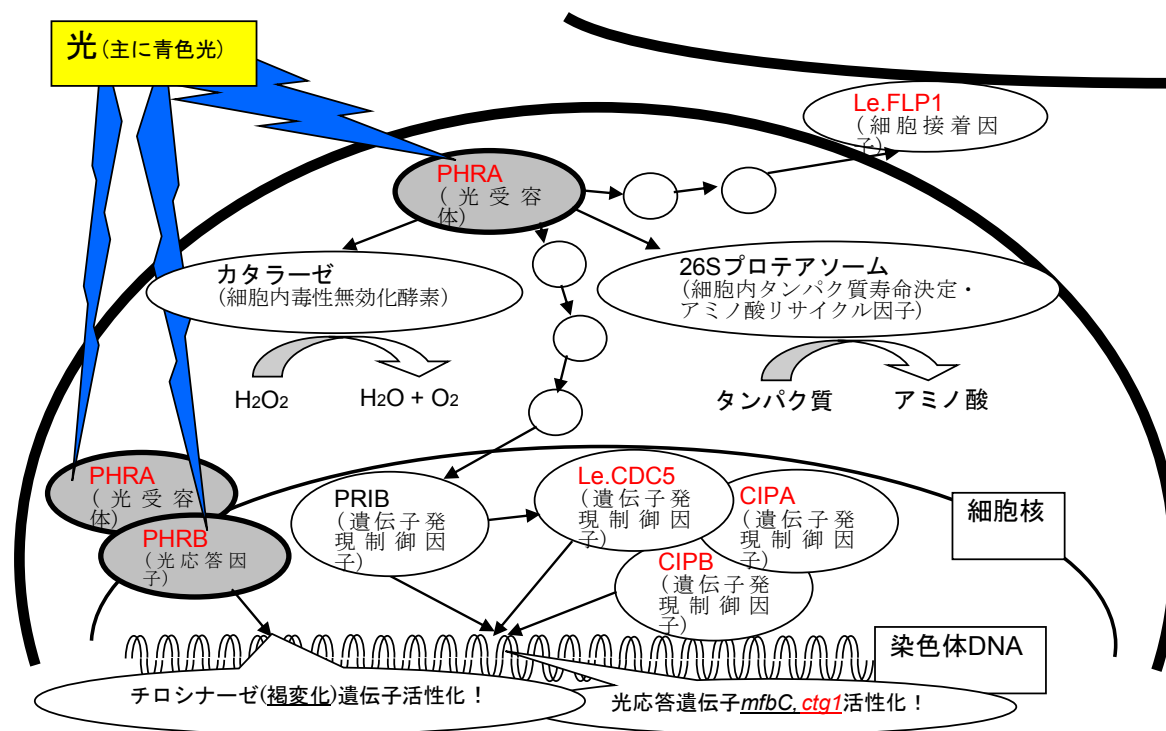


図1 光の受容と応答に関わるシイタケの遺伝子

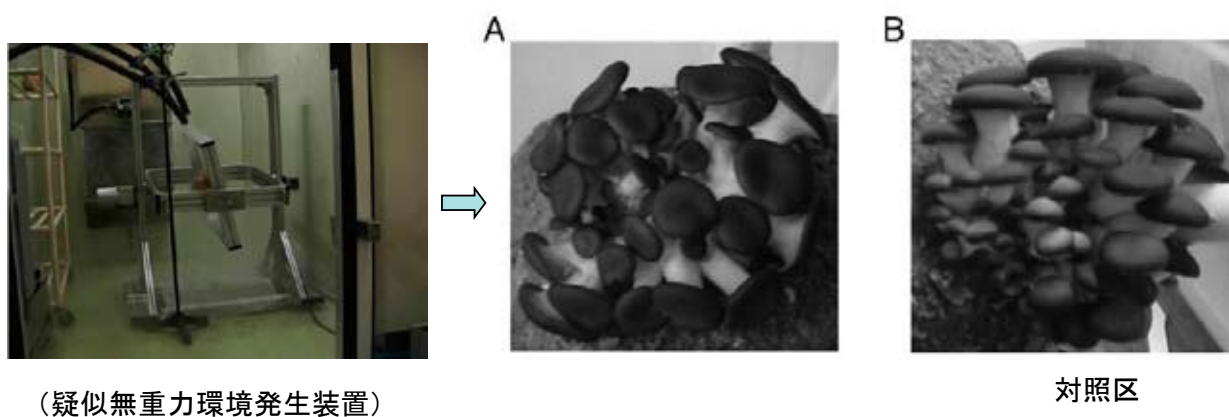


図2 微小重力(疑似無重力)環境で栽培したヒラタケの子実体

白色腐朽菌のリグニン生分解は 菌糸先端でおきることを明らかにしました

きのこ・微生物研究領域 微生物工学研究室 高野麻理子、中村雅哉、山口宗義

木材からの紙パルプ・バイオエタノール製造では、リグニンの分解に大量のエネルギーと薬品が必要です。環境に優しいリグニン分解法の要望は高く、酵素等を用いる温和なリグニン分解が注目されています。このため、パルプ漂白能力の高い白色腐朽菌 (*Phanerochaete crassa* WD1694 菌) のリグニン分解系を調べました。本菌では、リグニン分解酵素マンガネロキシダーゼと過酸化水素の生産酵素グリオキサルオキシダーゼの両酵素が必要であり、両酵素の分泌が重なる菌糸の先端で集中的に分解反応が生じることが分かりました。本成果は、環境に優しい紙パルプ・バイオエタノールの製造法の開発等で役立つと考えます。

研究の背景と目的

木材からの紙パルプ・バイオエタノール製造では、リグニンの分解に大量のエネルギーと薬品が必要です。環境意識の高まりの中で、環境への負担が高い大量の化石燃料の消費やリグニン分解過程で生じる化学廃液が問題視されています。一方、自然界では、白色腐朽菌が酵素反応による温和な反応条件で木材のリグニンを分解します。この能力を解明し利用できれば、環境に優しいリグニン分解法の開発に役立ちます。そこで、白色腐朽菌のリグニン分解について調べました。

リグニン分解酵素を探す

パルプ漂白能力の高い白色腐朽菌 (*Phanerochaete crassa* WD1694 菌) のリグニンを分解する酵素として、マンガネロキシダーゼが見つかりました。しかし、リグニンとマンガネロキシダーゼを混ぜただけでは分解は生じませんでした。マンガネロキシダーゼは反応のために過酸化水素を必要とします。そこで、過酸化水素を生産する酵素を探した結果、グリオキサルオキシダーゼが見つかりました (図1)。これらの酵素を精製し、性質を分析したところ、どちらの酵素も数種類あり、マンガネロキシダーゼは 2,6-ジメトキシフェノールやマンガニンイオンなど、グリオキサルオキシダーゼはメチルグリオキサル、グルコース、メタノールなどを酸化する能力があることがわかりました。

リグニン分解反応は菌糸先端で起こっている

白色腐朽菌は菌体の外側に酵素を分泌してリグニンを分解することは知られていましたが、具体的にどこでどのように分解されるかはわかっていませんでした。そ

で、本菌のリグニン分解反応が菌体の周辺のどこ部分で生じているか調べました。反応する部分の特定は、マンガネロキシダーゼが基質となるテトラメチルベンジンを酸化して不溶性の青色着色を生じさせる活性染色方法を用いました。その結果、菌糸の先端や菌糸に沿った部分が染まり、菌体の内部や菌体から離れたところは染まりませんでした (図2)。この結果は、リグニン分解反応が菌糸先端の周りで起きていることを示しています。また、顕微分光法で、菌糸先端の青色の濃さを測定し、酵素反応量に換算すると、菌糸先端のリグニン分解反応は非常に強いことがわかりました (図3)。

白色腐朽菌は菌糸先端で過酸化水素を生産する

リグニン分解が菌糸先端に集中する原因を酵素分布から調べました。リグニン分解酵素マンガネロキシダーゼは菌体の周囲に広く分泌されていましたが、過酸化水素を生産するグリオキサルオキシダーゼは菌糸先端にありました。そのため、過酸化水素が菌糸先端でのみ生産されてリグニン分解ペロキシダーゼ反応も菌糸先端で生じることがわかりました (図4)。

本研究の結果より、白色腐朽菌は菌糸先端という微小領域に集中して効率の良いリグニン分解反応を進めることがわかりました。今後、菌糸先端のリグニン分解条件をより詳しく調べることで、環境に優しいリグニン分解法の開発に役立つと考えています。

本研究は、実行課題「木材分解微生物の糖質及びリグニンの分解機構の解明」で行いました。

詳しくは Takano et al. (2010) J Wood Sci 56: 307-313 をご覧下さい。

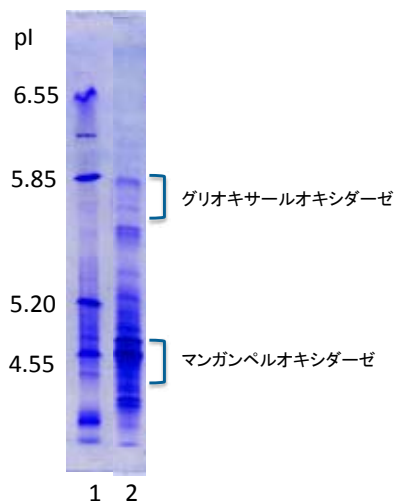


図 1. 電気泳動によって分離した
リグニン分解関連酵素
1, 等電点 (pI) マーカー;
2, WD1694 が生産する酵素

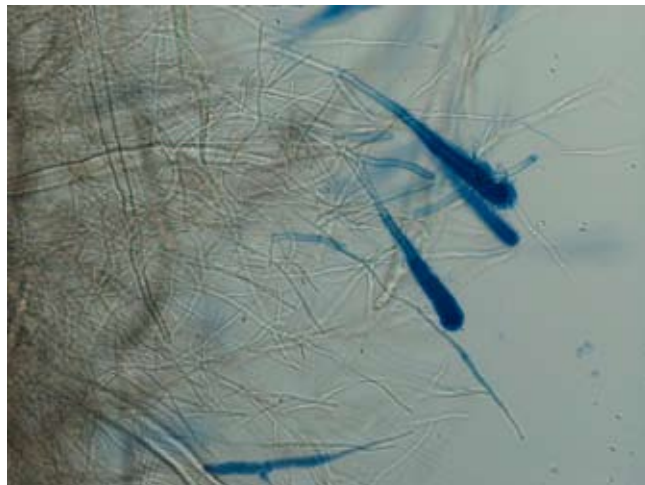
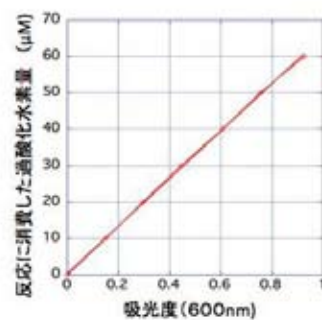
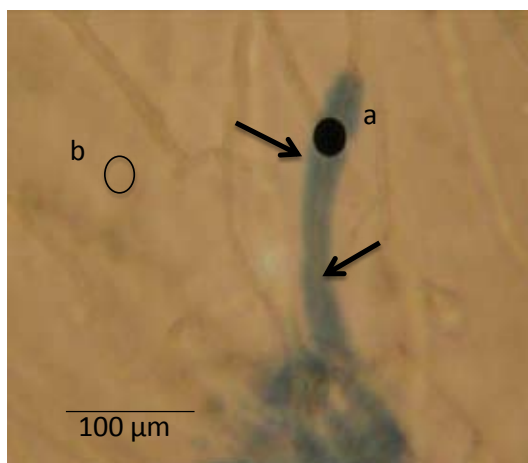


図 2. 菌体のペルオキシダーゼ活性染色

- 1) 菌糸先端がペルオキシダーゼ活性染色で青く染まった。
- 2) 菌糸内部、菌糸から離れたところは染まらなかった。



青色の濃度(吸光度)は、反応量が多いほど高い。

(検量曲線)

図 3. 顕微分光法によるペルオキシダーゼ活性の測定

- 1) ペルオキシダーゼ活性染色によって、菌糸先端が青く染まる(矢印部)
- 2) スポットの吸光度(色の濃度)を顕微分光で測定する。(a, 1.35; b, 0.02)
- 3) 検量曲線から反応量を算定する。

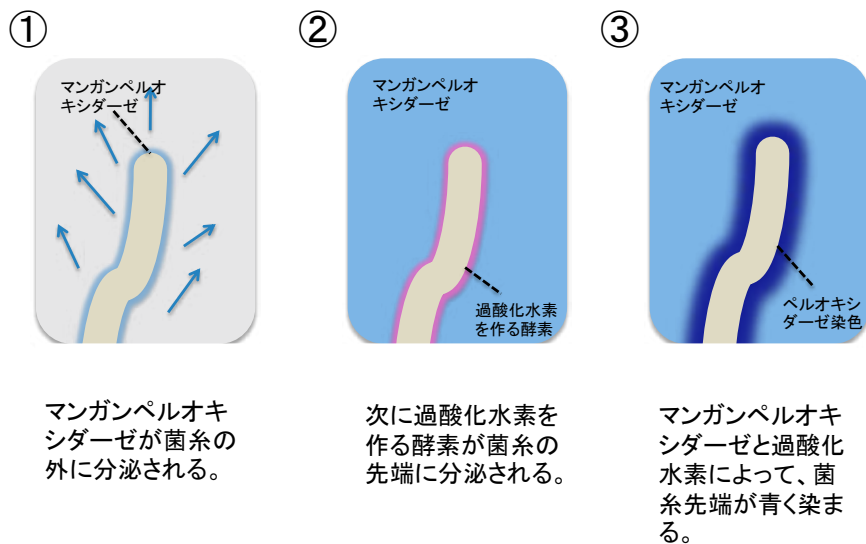


図 4. 菌糸先端でリグニン分解酵素が反応する様子

ウラスギとオモテスギの地域分化を示す遺伝子を発見しました

森林遺伝研究領域
国際農林水産業研究センター
東京大学
総合研究大学院大学
林野庁

津村義彦、伊原徳子
谷 尚樹
岩田洋佳
角 友之
高橋友和

スギは我が国の固有種で、その天然林は北は青森県の鱒ヶ沢から南は鹿児島県屋久島まで降水量の多い地域に分布しています。現在の天然分布は長い歴史の中で様々な気候変動や環境の影響を受けて形成されたものです。スギは針葉や枝の形質から二つの変種に分けられ、多雪地帯の日本海側に分布するものをウラスギ、雪の少ない太平洋側に分布するものをオモテスギと呼んでいます。これらは遺伝的に分化していることがわかっているため、その原因遺伝子の探索を行ったところ、関連のある遺伝子が見つかりました。

研究の背景と目的

スギは我が国の固有種で、その天然林は北は青森県の鱒ヶ沢から南は鹿児島県屋久島まで降水量の多い地域に分布しています。現在の天然分布は長い歴史の中で様々な気候変動や環境の影響を受けて形成されたものです。現在では伐採や開発の進行により、天然林は全国的にわずかな面積しか残っていません。しかし、世界遺産に指定された屋久島には例外的に大面積のスギ天然林が残されています。また、スギは針葉や枝の形質から二つの変種に分けられ、多雪地帯の日本海側に分布するものをウラスギ、雪の少ない太平洋側に分布するものをオモテスギと呼んでいます。太平洋側の天然スギの分布は伊豆半島周辺や紀伊半島、四国、屋久島などに限られ、天然林の多くは日本海側に分布しています。

このようなスギを人工的に育林する場合にも、将来の資源として保全する場合にも、地域の環境に適した遺伝子を保有していることが重要です。そのため、地域環境への適応に関係する遺伝子の探索を目的として、研究を行いました。

スギ天然林の遺伝的な違い

スギ天然林の北限の鱒ヶ沢から南限の屋久島にかけての29箇所の森林を選定し、これらのスギ天然林集団がもつ148個の遺伝子についてDNAの塩基配列の違いを解析したところ、地域間のスギ天然林の遺伝的な違いはわずかに5%程度でした。つまり、スギの持っている遺伝的多様性の95%はどの天然林内にも共通して含まれているということです。しかし、スギの遺伝的分化では、このわずか5%の遺伝的な違いが重要で、この中にそれぞれの地域環境に適応した遺伝子が含まれていることに

なります。

この5%の違いを生み出している遺伝子の塩基配列を丹念に調べていくと、調査した148個のうち5つの遺伝子が淘汰に関わっている遺伝子である可能性ができました。さらに、その中にはオモテスギとウラスギの遺伝的分化に大きく関与していると考えられる二つの候補遺伝子が見つかりました。日本海側と太平洋側の環境の違いにより自然淘汰を受けた結果、これらの遺伝子に違いが生じた可能性が考えられます。植物は様々な環境に適応するために、遺伝子は長い年月をかけて変化していきます。現段階ではこれらの遺伝子の機能は分かっていませんが、検出された対立遺伝子の有無がその環境で生き残るための重要な指標となることは確かです。樹木で異なる環境への適応性に関連した遺伝子の発見は、世界的に見てもボブラの開葉期に関連する遺伝子など、まだわずかな報告があるだけです。

適応的遺伝子の活用

今後、環境適応性に関連するさらに多くの遺伝子を検出することにより、それを指標として、それぞれの地域環境に適応した対立遺伝子を保有するスギの苗を効率的に生産し、周囲の生態系にあった生長のよい植林を行うことが可能になります。また、森林の保全や遺伝資源の保全のための重要な指標としての活用も期待されます。

本研究は、森林総研一般研究費「主要樹種の遺伝構造及び適応的遺伝子の解明」による成果です。

詳しくは Tsumura et al. (2007) Genetics 176: 2393-2403 をご覧下さい。

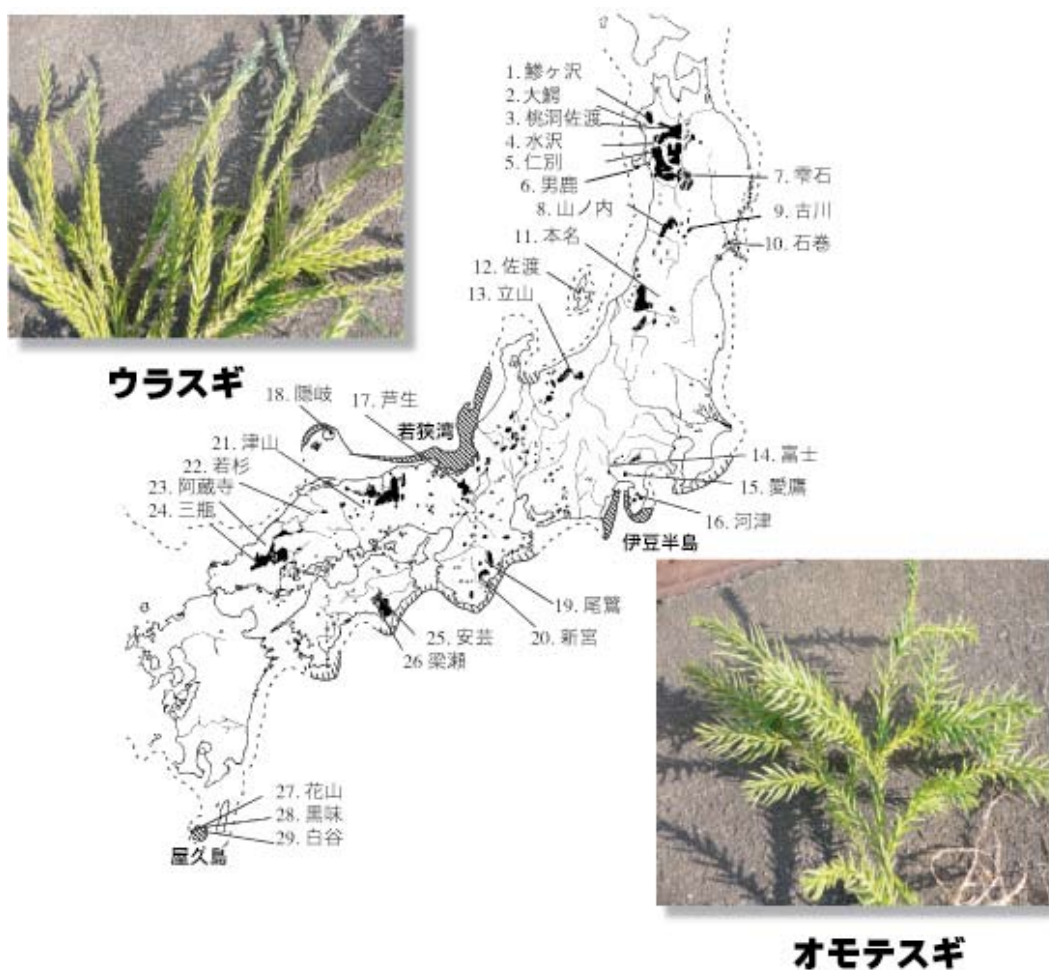


図1 スギ天然林の分布（林 1960）。
最終氷期（約1万8千年前）のスギの逃避地（若狭湾、伊豆半島、屋久島などの網掛け部分）及び今回調査した29集団を示します。写真はウラスギとオモテスギの針葉形態です。

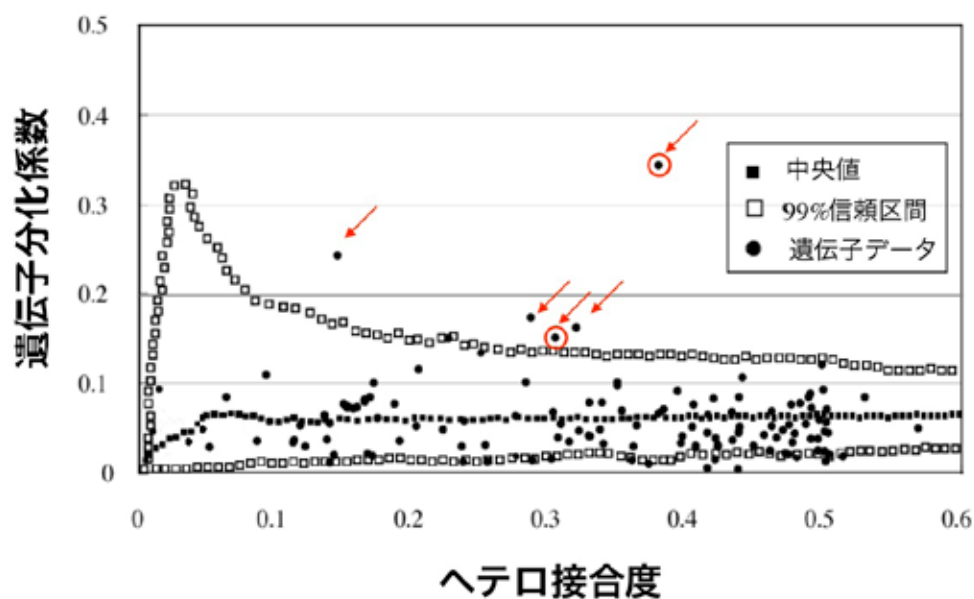


図2 淘汰を受けている遺伝子の検出。
99%信頼区間の上にある5つの遺伝子（赤い矢印）が淘汰を受けた候補遺伝子です。
ウラスギとオモテスギを分ける候補遺伝子はこのうちの2つの遺伝子（赤丸印）です。

貴重なヒノキ天然林の遺伝的特徴を明らかにしました

森林遺伝研究領域 松本麻子、津村義彦、谷 尚樹（現在国際農林水産業研究センター）
元筑波大学 内田煌二

有用針葉樹であるヒノキの天然林は、近年になって保護されるようになるまでに過度の開発と伐採が繰り返され、わずかに残存する林はたいへん貴重なものになってしまいました。この研究では、地域環境に適した育林と資源保全の指標となる遺伝子の情報を得るため、それぞれの天然林についてDNA分析を行いました。天然分布の南端と北端の天然林はユニークな遺伝的特徴を保持し、分布が比較的集中している中部山岳地の天然林は遺伝的多様性が高いことが明らかになりました。また、1個の適応的遺伝子の候補が検出されました。

研究の背景と目的

現在ではわずかに残存する状態となったヒノキ天然林ですが、それぞれの地域環境に適した遺伝子を研究するための貴重な財産です。人工的な育林の場合にも、資源として保全する場合にも、地域の環境に適した遺伝子の保有が重要です。このような適応遺伝子の探索と地理的分化の解明を目的として、研究を行いました。

遺伝的多様性の特徴

マイクロサテライトマーカー13座を用いて、ヒノキ天然林の分布域（北限の福島県いわきから南限の鹿児島県屋久島まで）から選んだ25ヶ所の天然林の解析を行いました（図1）。マイクロサテライトマーカーは核DNAに存在する多様性に富むDNAマーカーとして、遺伝的な情報の把握に役立つことが期待されるマーカーです。解析の結果、各々の天然林の間の遺伝的な違い（遺伝的分化）は小さく、ヒノキ天然林の全体からみて4.0%と低いものでした。各々の天然林が遺伝的にどの程度多様性に富んでいるかを調査したところ、分布域の北限のいわきや南限に近い小林で多様性が低下していることが分かりました。この結果は、天然林の分断化や過開発が影響していると考えられます。一方、天然林が広く残っている中部地方では、遺伝的多様性も高い状態で保持されていました。

南北で異なる遺伝要素と適応的な遺伝子候補の検出

ヒノキ天然林は集団間の遺伝的分化の程度は低かったものの、遺伝的特徴が南北で異なることが明らかになり

ました（図2）。ヒノキ天然林は4タイプの遺伝要素から成り立っていて、北限のいわき天然林や南限の屋久島天然林は、他の天然林と全く異なるユニークな遺伝的特徴を示しました。それ以外の天然林は、複数タイプの遺伝要素が混合しており、割合が徐々に変化しました。また、マイクロサテライトマーカーのCos2619遺伝子座は、天然林ごとの対立遺伝子頻度が、自然選択に対して中立な状態から予想される以上に大きく異なっており、適応的な遺伝子の候補になり得ると考えられます。

資源の保全に向けて

これらの研究結果から、分布域の端及び端に近い天然林は、遺伝的多様性が低下していること、他の地域の天然林と遺伝要素がかなり異なることなどから、今以上に個体数が減少しないように保全する必要があることが分かりました。また、個体数が多く多様性が保持されている中部の天然林も、多様な遺伝資源を確保する上で保全の意義が高いと言えます。本研究で得られた適応的遺伝子の検出を端緒として、ヒノキの適応的遺伝子の情報を増やすことにより、各地域の環境適応に関係する対立遺伝子を具体的に指定できるようになると期待されます。

本研究は、科学研究費補助金「希少な森林となっている主要針葉樹天然林の保全遺伝学的研究」による成果です。

詳しくはMatsumoto et al. (2010) Journal of Plant Research 123: 689-699 をご覧下さい。



図1 解析したヒノキ天然林

ヒノキの天然林はごく限られた面積となって各地に散在しています。天然分布の範囲を網羅するように、北限のいわきから南限の屋久島まで 25 カ所の天然林を解析しました。

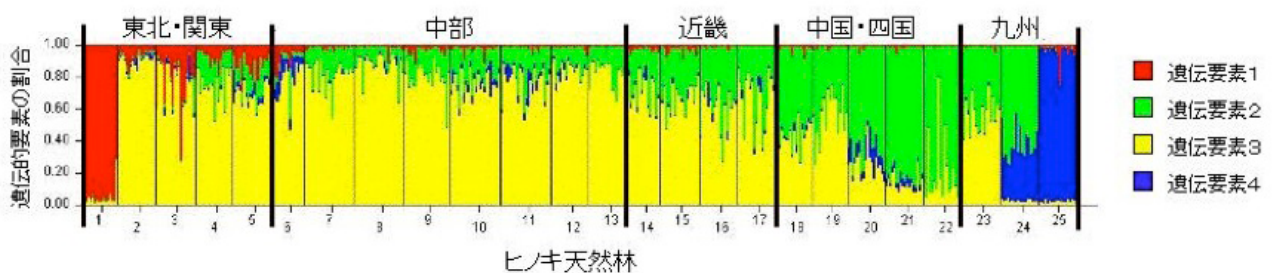


図2 ヒノキ天然林における4タイプの遺伝要素の割合

25 カ所の天然林の間の遺伝的関係を推定するために、遺伝要素というものを考えます。実際の天然林はいくつかの遺伝要素が混じり合った状態と考えられ、混じり合いの状態が似ていればそれらの天然林は遺伝的に似ており、混じり合いの状態が似ていなければそれらの天然林は遺伝的な関係が希薄であると考えられます。例えば、北限のいわき (1) は遺伝要素 1 で占められ、遺伝要素 3 に割合が多い矢板 (2) 以南の天然林とはかなり異なっています。また、南限の屋久島 (25) は遺伝要素 4 で占められ、すぐ北にある小林 (24) とは3分の1くらい似ていますが、英彦山 (23) 以北とは全く似ていません。また中間的な位置にある天然林は遺伝要素 2 と 3 に割合が徐々に変化し、遠く離れるほど違いが大きくなることがわかります。

トウヒ属樹種の地理的遺伝構造を明らかにしました

森林植生研究領域
宇都宮大学（森林総研客員研究員）
森林遺伝研究領域

勝木俊雄
逢沢峰昭
吉丸博志

トウヒ属（*Picea*）樹種は、亜寒帯針葉樹林の主要な構成樹種で、日本には6種が分布しています。このうち、エゾマツとトウヒ及びヤツガタケトウヒについて、近縁種との関係を含めた各地域集団の遺伝的位置付けに基づく適切な保全策を検討するため、地理的遺伝構造の実態を解析しました。その結果、エゾマツとトウヒは従来考えられていたよりかなり遠い関係にあることが明らかになりました。また、ヤツガタケトウヒは八ヶ岳と南アルプスで遺伝的に分化し、八ヶ岳では集団内の遺伝的多様性が非常に低いことが分かりました。

研究の背景と目的

エゾマツ、トウヒ、チョウセントウヒを合わせたエゾマツ変種群は、日本・ロシア・中国・朝鮮半島などの日本海周辺地域に分布し、国内では北海道全域にエゾマツが、本州の中部山岳と紀伊半島にトウヒが自生しています。トウヒは最終氷期には東北地方にも連続的に分布していたものと考えられていますが、現在の分布は非常に限られています。また、ヤツガタケトウヒは絶滅危惧IB類に指定され、本州中部の八ヶ岳と南アルプスにのみ自生しています。南アルプスの集団はヒメマツハダという別種とされ、八ヶ岳ではヤツガタケトウヒと混在すると言われていました。

これらの絶滅危惧種および分布の縮小した集団について、近縁種間の関係および各地域集団の遺伝的位置付けに基づく保全策を検討するため、DNA分析による地理的遺伝構造の解析を行いました。

エゾマツとトウヒの遺伝的關係

エゾマツ変種群については、北海道のエゾマツはサハリンやロシア大陸部と、一方本州のトウヒは朝鮮半島との繋がりが強く、遺伝的な由来が互いに非常に異なるという想定外の関係が判明しました（図1）。また、紀伊半島のトウヒは遺伝的多様性が非常に低いことも明らかとなりました。

したがって、従来のようにトウヒは単に分布地が異なるだけのエゾマツと考えることは適切ではありません。

また、中部山岳と紀伊半島もそれぞれ独立の保全単位と考える必要があります。

ヤツガタケトウヒの地理的遺伝構造

ヤツガタケトウヒとヒメマツハダといった遺伝的に独立した2種は検出されず、ヤツガタケトウヒという1つの樹種と考えるべきだと結論されました。八ヶ岳地域の集団の多くは集団内の遺伝的多様性が非常に低く、また南アルプス地域の集団とは遺伝的にもかなり分化していることが明らかとなりました（図2）。大径木が多いため従来から保護林に指定されてきた八ヶ岳の1林分が、意外にも、保有する遺伝的多様性がかなり低いことも判明しました。

今回の解析結果に基づき、南アルプス地域の重要性が明らかとなり、八ヶ岳で1箇所、南アルプスで4カ所の保護林が新たに設定され、保全体制が強化されました。

本研究は、森林総研一般研究費「主要樹種の遺伝構造及び適応的遺伝子の解明」「希少及び隔離分布種の遺伝的多様性と遺伝的分化機構の解明」および科学研究費補助金「北東アジアにおける寒温帯性針葉樹種の系統地理学的研究」による成果です。

詳しくは Aizawa et al. (2007) *Molecular Ecology* 16: 3393-3405, Aizawa et al. (2009) *Journal of Biogeography* 36: 996-1007, Katsuki et al. (2010) *Journal of Forest Research*, Online First をご覧下さい。

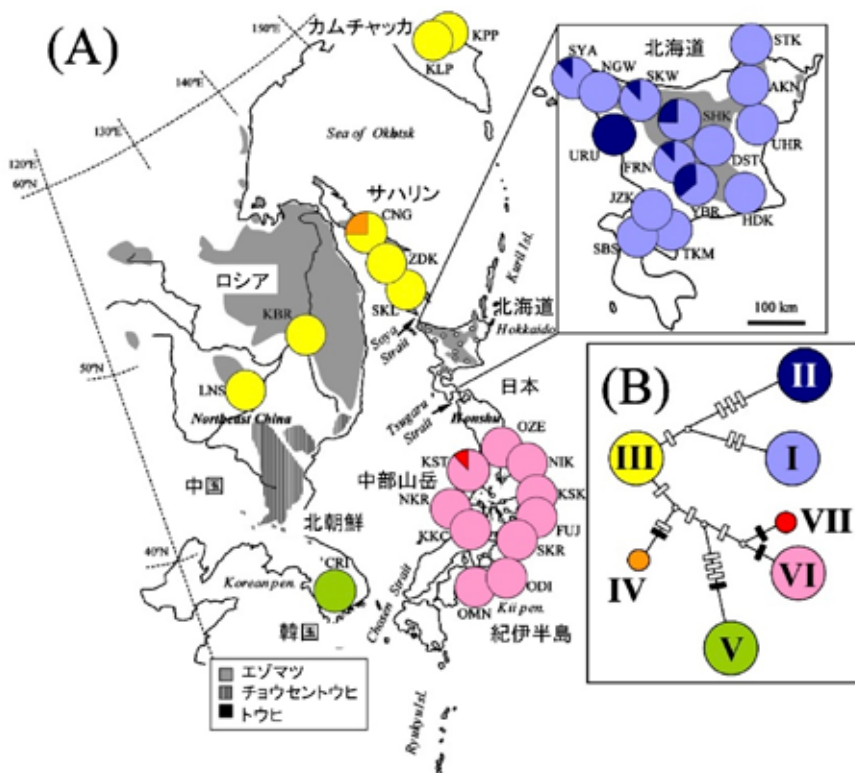


図1 エゾマツとトウヒを含むエゾマツ変種群の遺伝的な関係（ミトコンドリア DNA の遺伝マーカーによる解析）

A) 各地域の集団におけるミトコンドリア DNA の型、B) ミトコンドリア DNA 型の間の関係。北海道のエゾマツのタイプ I や II はロシアのタイプ III と近く、本州のトウヒのタイプ VI や VII は朝鮮半島のタイプ V などに近く、北海道のエゾマツと本州のトウヒは非常に遠い関係にあることがわかります。

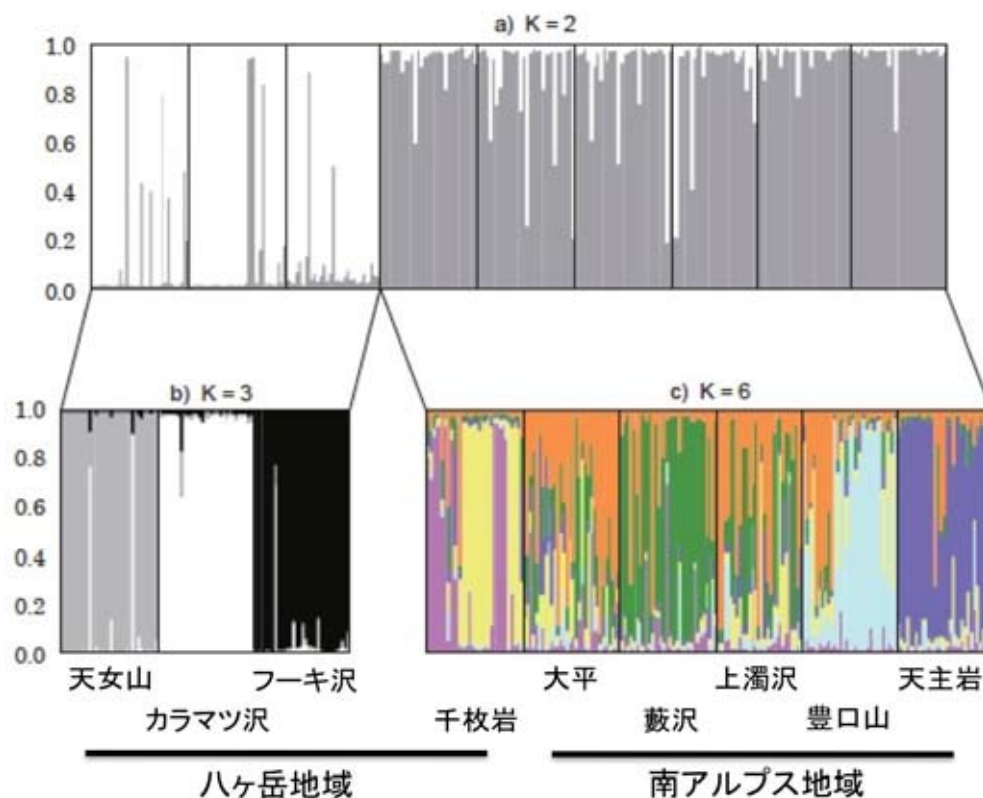


図2 ヤツガタケトウヒ集団における遺伝要素の割合（核 DNA の遺伝マーカーによる解析）

調査した 9 カ所の集団の間の遺伝的関係を推定するために、遺伝要素というものを考えます。それにより、まず「八ヶ岳の 3 集団」と「八ヶ岳 1 集団＋南アルプス 4 集団」に大別されました。次に、前者の 3 集団は互いにかなり異なる集団であることがわかりました。後者では、千枚岩や天主岩、豊口山の集団は他とかなり異なり、他の 3 集団は互いに似通っている関係にあることが明らかになりました。

希少樹種ユビソヤナギの遺伝構造と 遺伝的多様性を明らかにしました

森林遺伝研究領域
森林植生研究領域

菊地 賢
鈴木和次郎

ユビソヤナギは河川上流で河畔林を構成する希少樹種ですが、生育可能な自然度の高い河川環境は近年の開発により減少の一途にあります。本研究では、DNA分析を通して、開発等によるユビソヤナギの生育地の縮小・分断化が種子や花粉の移動の妨げとなり、将来的にユビソヤナギの遺伝的多様性の維持や、実生の更新に悪影響を及ぼす可能性を明らかにしました。こうした成果は、今後のユビソヤナギの保全や河畔林の健全な育成にとって重要な情報となります。

研究の背景と目的

ユビソヤナギは、関東から東北地方にかけての多雪地域に分布し、河川上流で河畔林を構成する希少樹種です。非常に限られた地域にのみ分布し、個体数が少ないため、環境省レッドリストで絶滅危惧Ⅱ類に指定されています。近年、ユビソヤナギの生育する自然度の高い河川環境は、開発等により減少の一途にあり、その自生地は縮小・分断化されています。このような自生地に生育する集団は、花粉や種子を通じた遺伝的多様性の補給を受けられなくなり、遺伝的多様性が減少し、近交弱勢などにより衰退に向かう恐れがあります。

そこで、各自生地における花粉や種子による遺伝的多様性の補給の有無や遺伝的多様性の減少の実態を解明することを目的として、研究を行いました。

DNA分析によるユビソヤナギの遺伝的多様性の解析

解析に用いた8個のマイクロサテライトマーカーは核DNAに存在し、多様性に富むため遺伝的な情報の把握に役立ちます。調査は、比較のため、最も原生的な河川環境を保ちユビソヤナギが連続的に生育する自生地に加え、自生地がところどころ分断化している自生地、さらには、生育地の分断化が進みユビソヤナギがわずかしかなかった自生地で行いました。

調査の結果、生育地の分断化が進み、ユビソヤナギ集団の分布が疎になっている自生地ほど、遺伝構造（自生

地内の集団間の遺伝的な結びつき）が弱くなっていく傾向が見られました（図1）。さらに、自生地の縮小・分断化が著しい箇所では、孤立した集団の遺伝的多様性が低下していることが分かりました（図2）。こうした結果は、今後さらにユビソヤナギの生育地の分断化が進むと、集団を遺伝的に結びつける種子や花粉の移動が十分でなくなり、集団が遺伝的に孤立、やがて遺伝的多様性が減少し、衰退する恐れがあることを示していると考えられます。

保全への提言

以上から、生育地の分断化が進み遺伝的劣化の進んだ自生地においては、世代の進行と共にさらなる劣化が進む可能性が明らかとなりました。他の自生地においても、ユビソヤナギ集団の遺伝的多様性が維持される環境を保全するためには、不必要な河川改修を抑制し、少なくとも現状程度に流域単位で自然度の高い河畔林を連続的に残していく必要があります。

本研究は、森林総合研究所一般研究費「希少及び隔離分布種の遺伝的多様性と遺伝的分化機構の解明」による成果です。

詳しくは菊地ら (2010) 保全生態学研究 15:89-99 及び Kikuchi et al. (2010) Conservation Genetics 12: 79-89 をご覧下さい。

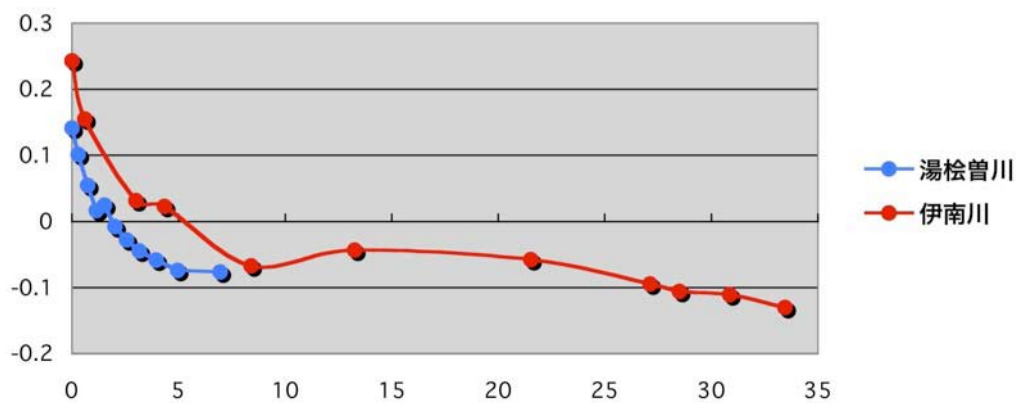


図1 原始的な河川環境を残す湯檜曽川（群馬県）と生育地の分断化が進む伊南川（福島県）との遺伝構造の比較
横軸には地理的距離（km）、縦軸には個体間の遺伝的な近さを示す指数（Kinship）を示します。湯檜曽川のほうがグラフの傾きが大きく、近隣集団の遺伝的結びつきが強いことを示しています。

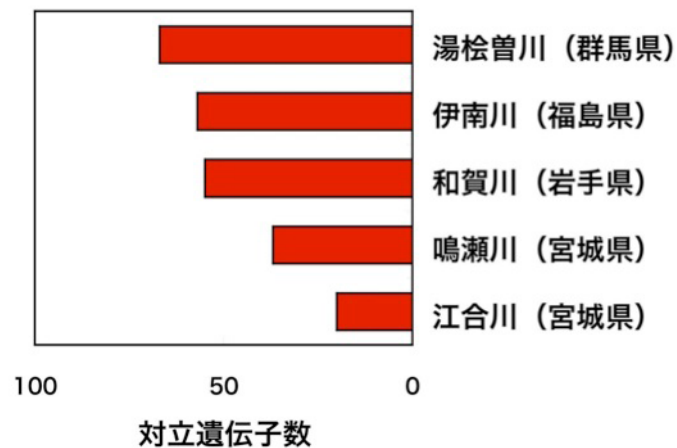


図2 ユビソヤナギ各自生地ごとの遺伝的多様性（マイクロサテライト8座で見つかった遺伝子型の総数）
生育地が縮小・分断化した鳴瀬川、江合川で遺伝的多様性の減少が著しいことが示されます。

希少樹種クロビイタヤの生育地断片化が 遺伝子流動に与える影響を明らかにしました。

森林遺伝研究領域
筑波大学
北海道大学

永光輝義
田中健太
堀田万祐子

絶滅危惧種クロビイタヤは、人為的な土地利用を受けやすい河川沿いに生育するため、多くの生育地が断片化しています。虫媒という特徴に注意して、クロビイタヤの遺伝子流動に及ぼす生育地断片化の影響を調べました。農地や市街地によって断片化した生育地では、個体数が少なくなると種子の充実率は低下しました。また、農地よりも市街地で、花粉媒介昆虫の移動が妨げられ、遺伝子流動が減少しました。つまり、生育地の断片化によって、個体数が種子生産量に、周辺環境が媒介昆虫の行動を通して遺伝子流動に影響していました。これらの成果は、保全すべき生育地の選定とその管理や育成のための種苗の収集に役立てることが出来ます。

研究の背景と目的

クロビイタヤは、5つに切れ込んだ葉が美しい落葉高木です（写真1）。本種は日本固有で、北海道南部および東北部と中部山岳とに分布しています。クロビイタヤの好む生育地は、河川に沿った湿った土地です。そのような生育地は人為的な土地利用によって減少し、本種は絶滅危惧IB類に指定されています。

樹木の絶滅危惧種の研究は風媒（風によって花粉が媒介される）樹種に関するものが多く、虫媒樹種における特徴を解明するため、本種の生育地断片化が遺伝子流動に与える影響を調査しました。

断片化による種子生産の減少

北海道千歳市では、千歳川やその支流に沿って河畔林や防風林が残され、市街地やその郊外でクロビイタヤを見ることができます（図1の1）。しかし、その生育地は市街地や農地によって分断され、クロビイタヤの集団は断片化しています（図1の2）。断片化した集団を調べたところ、個体数の少ない孤立した集団では種子の充実率が低いことがわかりました（図1の3）。100個体以上の成木がある集団では種子充実率が24%以上だったのに対し、周辺500m以内に他個体がない孤立木では1%未満でした。

市街化による遺伝子流動の減少

クロビイタヤの花は、ケバエというハエ類の昆虫によって花粉が媒介されます。農地によって分断された集団では、個体数の少ない集団でも種子どうしの血縁は薄く、集団外との遺伝子の交流が保たれていました。（図1の4）。しかし、市街地によって分断された集団では、花粉を媒介する昆虫の移動が妨げられるために遺伝子の交流が少なく、集団内の種子が互いに近縁になっていました。

クロビイタヤの保全のために

本研究から、生育地の断片化によって、個体数が種子生産量に、周辺環境が遺伝子流動に影響していることがわかりました。風媒樹種では断片林分間の距離が重要で、市街地であるか農地であるかという環境はさほど影響しないことが普通ですが、虫媒樹種ではその違いが重要となります。この成果は、クロビイタヤの保全活動に役立てるとともに、他の虫媒の希少樹種の保全に重要な参考情報となります。

本研究は、森林総合研究所一般研究費「希少及び隔離分布種の遺伝的多様性と遺伝的分化機構の解明」による成果です。



写真1 絶滅危惧種クロビイタヤの樹皮（左）や葉、果実（右）

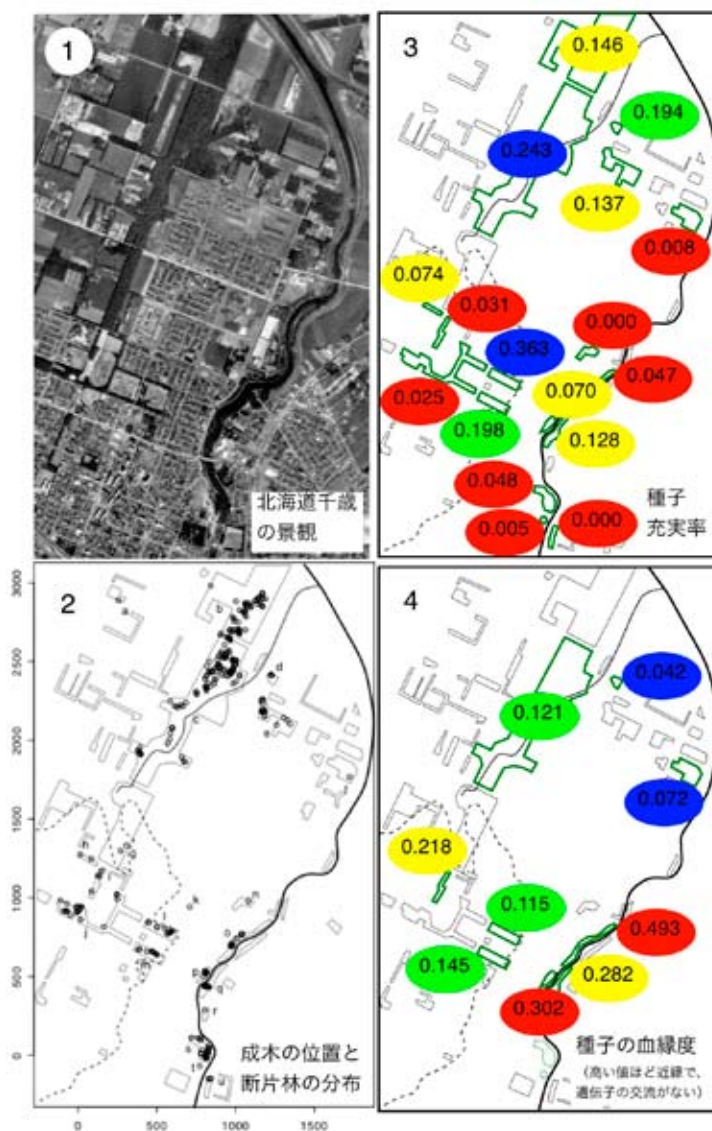


図1 北海道千歳市の断片化したクロビイタヤの生育地における種子充実率と種子血縁度

1：空中写真での景観、2：成木（○）と断片林（□）の分布、3：種子の充実率（青いほど種子生産が多く、赤いほど少ない）、4：種子の血縁度（青いほど血縁が薄いので遺伝子流動が多く、赤いほど近縁で遺伝子流動が少ない）、を示します。

ヒラタケ属きのこ“バイリング”の 分類学的位置を明らかにしました

きのこ・微生物研究領域
元旭松食品株式会社

馬場崎勝彦、根田 仁
河合源四郎

新しいきのこの栽培化は、きのこの消費拡大に大いに役立ちます。バイリング（白灵菇：Bai Ling）は、中国で栽培化されたエリンギに似たきのこですが、日本で2003年ころから栽培が始まりバイリングを含め数種類の商品名で販売されてきました。しかし、その食品表示や品種登録等を適正に行う上で、バイリングの分類学的位置が不明なため問題がありました。本研究では、分子系統指標等を用いてその分類学的位置を解明しました。バイリングはヒラタケ属エリンギと同種で、中国で進化したエリンギ変種であることが分かりました。本成果は、きのこの種苗登録や食品表示に関わる行政を円滑に実施する上で大変役立っています。

研究の背景と目的

バイリングは中国新疆ウイグル地区の砂漠に自生するセリ科植物フェルラ属の植物に寄生するヒラタケ属のきのこに由来する栽培品種です。日本では2003年ころから栽培され、数種類の商品名で販売されていました。また、新種として品種登録を行う動きもありました。しかし、行政的には、分類が不明なため適正な表示指導が出来ないことや、新種として品種登録を受けることの適否が問題となっていました。このため、バイリングの分類学的位置を調べました。

バイリングの生物学的種分類

日本で栽培されるバイリングの元品種と判断される中国産品種の品種としての違いを調べました（図1）。中国で入手した9品種は、中国の主要な2品種に由来することが分かりました。次に、この2品種の生物学的種分類を行うため対照種としたエリンギと交雑試験を行いました。エリンギは地中海沿岸、東欧、中央アジア等で、バイリング同様、セリ科エリンギウム属やフェルラ属を寄主として自生するヒラタケ属のきのこです。エリンギ属を寄主とするものを *Pleurotus eryngii* または *P.eryngii* var.*eryngii*、フェルラ属を寄主とするものを *P.ferulae* または *P.eryngii* var.*ferulae* と別種または変種と分類されてきました。交雑試験の結果、バイリング品種間及びバイリングとエリンギ変種間の交雑の成功率は高く（表1）、バイリングとエリンギの交雑株であるF1及びF2は子実体（きのこ）を作りました（図2）。つまり、バイリングはエリンギと生物学的に同種と判定できました。

エリンギの変種と学名を調べる

バイリングの学名は、1987年の最初の報告では *P.eryngii* var.*touliensis* C.J.Mou と記載されました。し

かし、一般にはイタリアのシチリア島で収集されたセリ科植物に寄生するヒラタケ属の標本に付けられた学名 *P.nebrodensis* (Inzanga) Quél. が使われることが多く、その真偽を確かめました。まず、*P.nebrodensis* のタイプ標本（図3）の分子系統指標（IGS1やITS領域の部分のDNA塩基配列）を調査しました。タイプ標本の指標は、*P.nebrodensis* と表記されるきのこのうち、シチリア島で収集された菌株のものと完全に一致しましたが、イタリア半島で収集された *P.nebrodensis* 菌株やエリンギ、バイリングのものとは明らかに違いました（図4）。これは、シチリア産菌株のみが *P.nebrodensis* であり、エリンギやバイリングは別のグループであることを示します。次に、シチリア産菌株とエリンギ、バイリングとの交雑試験を行い、三者が相互に交雑でき同種であることを確認しました。これらのことから、バイリングは中国で進化したエリンギの変種であり、学名は、*P.nebrodensis* ではなく、むしろ、最初に報告された *P.eryngii* var.*touliensis* C.J.Mou を用いることが適切と結論しました。

本成果は、行政が担当する食品の表示指導や種苗登録で、バイリングをエリンギ種として扱う科学的根拠として役立っています。

本研究は、実行課題「きのこ類の生理生態学的解明」で行いました。

詳しくは Kawai et al. (2008) Mycoscience 49: 75-87 をご覧下さい。

略号の説明

IGS1、ITS は、Intergenic Spacer 1、Internal Transcribed Spacer の略号です。両者はリボゾーム RNA 遺伝子を繋ぐ DNA 領域の名称です。

図1 バイリングと *P. nebrodensis* の地理的關係

図2 バイリング品種 (1)、エリンギ (2)、及び両者の交雑株 (3) の子実体

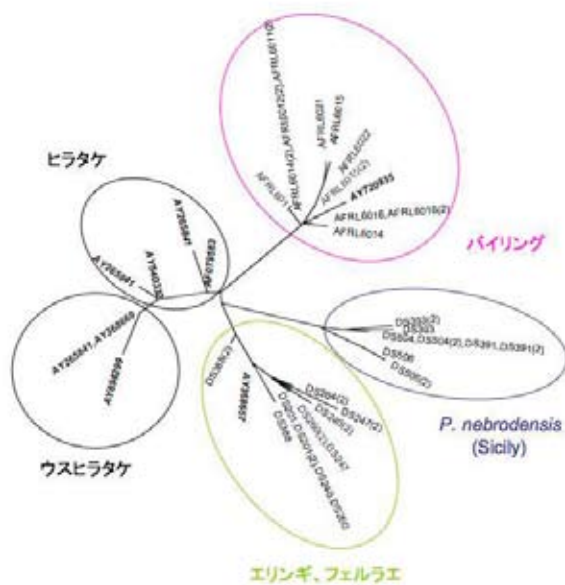
図3 *P. nebrodensis* のタイプ標本

図4 ITS1 の DNA シーケンスを基にした系統樹

表1 バイリングとエリンギ及びその変種との交雑試験

交雑株の親株名	交雑株の親株名	交雑率(%)
バイリング品種1	バイリング品種2	100
バイリング品種1	<i>P. eryngii</i> (エリンギ)	65
バイリング品種1	<i>P. ferulae</i> (フェルラエ)	82
<i>P. eryngii</i> (エリンギ)	<i>P. ferulae</i> (フェルラエ)	98

アジア産マツタケのDNA原産国判別法を開発しました

きのこ微生物研究領域きのこ研究室 村田 仁、馬場崎勝彦

食の安全・安心が強く求められる中で、輸入食材の原産国表示等の信頼性確保がより重要となっています。マツタケは商業価値の高い野生きのこですが、日本で流通するマツタケの約95%は外国産であり、適切な関税の実施や適正な価格の設定からそのトレーサビリティ管理が求められています。本研究では、アジア産マツタケのトレーサビリティ管理を可能にするDNA原産国判別法を開発しました。本判別法では、日本産、朝鮮半島地域産、中国北東部産、チベット地域産のマツタケを誤判率5%で識別可能です。本判別法は、マツタケのトレーサビリティ管理に役立ちます。

研究の背景と目的

アジア産、地中海沿岸産及び北米産のマツタケはきのこの形態からそれぞれ区別がつき、分類学的な種も異なります(図1)。しかし、アジア産マツタケは同じ種で、形態による区別は困難です。そのため、輸入されたアジア産を国内産と詐称される恐れがあり、これらを判別する技術が望まれていました。私たちは、マツタケの進化過程の解析に利用できる「レトロトランスポゾン」というDNA配列に着目し、アジア産マツタケのDNA原産国判別法の開発に取り組みました。

DNAマーカーの開発

私たちが着目したレトロトランスポゾンは、マツタケの染色体におびただしい数で存在することから、マツタケが種として確立された過程で増え、染色体上の位置を転移した、マツタケに特有のDNA配列と考えられます。つまり、レトロトランスポゾンの数と局在は、マツタケの進化の痕跡なのです。今回、マツタケがアジア各地に拡がりながら進化した過程を推定できるレトロトランスポゾンを見つけ出し、これを指標にしてアジア産マツタケの原産国判別法を開発しました。

DNA分析方法

今回開発した方法は、農産物の品種判別や環境中の微生物の検査、血縁関係の分析や犯罪捜査など、幅広い分野で使われているPCR法という簡便なDNA分析法です。本法では、レトロトランスポゾンが集まった領域の

長さを指標に用いました。この分析法を使うことにより、試験したマツタケ95菌株で、日本産、韓国・北朝鮮産、中国北東部産、チベット地域産のマツタケを誤判率5パーセントで識別可能でした。また、極東地域産のマツタケ同士、あるいはチベット地域産のマツタケ同士は類縁性が非常に高いこと、その一方で極東地域産とチベット地域産の間には類縁性が低いことが分かりました(図3)。

成果の活用法

DNA分析によるアジア産マツタケの原産国判別が誤判率5パーセントで出来るようになりました。その結果、トレーサビリティ管理への応用が可能になり、日本のマツタケ市場で必要な場合に遺伝子判別できるということが産地詐称を防ぎ、適正な価格設定や品質管理など販売者と消費者との信頼関係、関税の公正性の面から取引相手国と日本国との信頼関係の構築に役立ちます。本研究は、財務省関税中央分析所と緊密に連携して行われました。現在、本成果を検査の現場に役立てていただくために、本判別法の詳細を森林総合研究所ホームページ(<http://www3.affrc.go.jp/ReNewHP/labs/matsutake/>)に公開しています。

本研究は、実行課題「きのこ類の生理生態学的解明」で行いました。

詳しくは、Murata et al. (2008) Applied and Environmental Microbiology 74: 2023-2031 をご覧下さい。



図1 アジア産（日本産と中国産）と地中海沿岸産（トルコ産）マツタケ

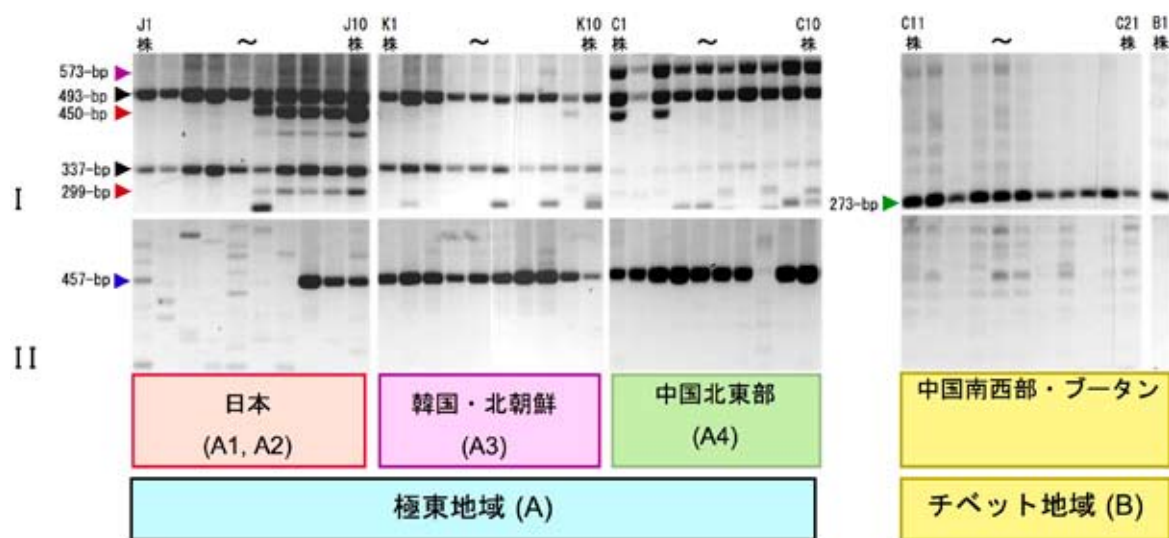


図2 PCR法によるDNA分析結果の例
(IとIIの2つの分析系を使用し、DNAの有無と長さ (bpで表示) を反映したバンドで識別)

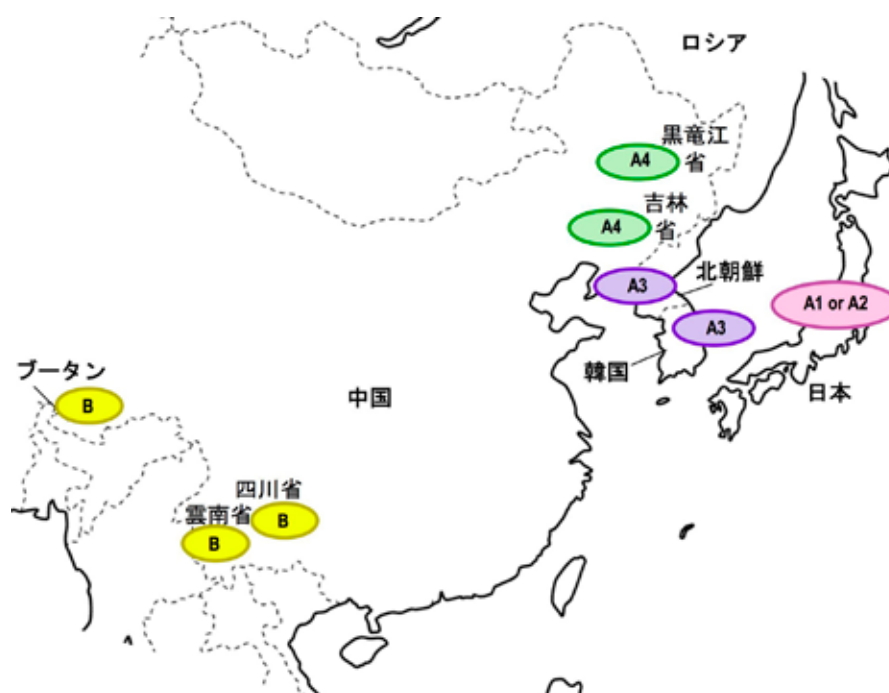


図3 レトロトランスポゾンに基づくアジア産マツタケの分布

Memo.

森林総合研究所

第2期中期計画成果集

発行日	平成23年3月
編集・発行	独立行政法人 森林総合研究所 茨城県つくば市松の里1 電話 029(873)3211 (代表)
お問い合わせ	企画部研究情報科
メールアドレス	kanko@ffpri.affrc.go.jp
ホームページ	http://www.ffpri.affrc.go.jp
印刷所	大成印刷株式会社 茨城県日立市東多賀町 4-11-7 電話 0294(36)1837 (代表)

本誌から転載・複製する場合は、森林総合研究所の許可を得て下さい。

森林総合研究所

第2期中期計画成果集

独立行政法人 森林総合研究所

茨城県つくば市松の里1 URL <http://www.ffpri.affrc.go.jp/>

リサイクル適性の表示:紙へリサイクル可