

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14749

研究課題名(和文) 針葉樹更新初期に顕在化する近交弱勢遺伝子のゲノムワイド探索

研究課題名(英文) Genome-wide scan of genes related to inbreeding depression emerged at the early stage of regeneration in conifers

研究代表者

後藤 晋 (GOTO, SUSUMU)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・准教授

研究者番号：60323474

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：針葉樹の近交弱勢に関連する遺伝子を探索するため、エゾマツ天然木2個体から種子を採取して制御環境下で育成した。親2個体をリファレンスにしてRAD-seq解析を行った結果、4,666座24,276SNPsが得られた。各実生の内的近縁度(IR)と成長に有意な関係はなかったが、IRが高い実生は成長が遅かった。遺伝子座ごとに遺伝子型と成長の関係を調べた結果、96座133SNPの遺伝子型で有意な違いがあった。トドマツのアルビノ黄色個体と健全緑色個体でRNA-seq解析を行った結果、黄色個体の遺伝子発現が緑色個体の30倍以上であった遺伝子のうち、フラボノイド生合成系に関連する遺伝子が有意に高かった。

研究成果の概要(英文)：To detect functional genes related to inbreeding depression in conifers, open-pollinated seeds were collected from two natural trees of *Picea jezoensis*. Seeds were sown and grew in a greenhouse. The RAD-seq analysis of resulting seedlings with reference to two parental genotypes revealed 24,276SNPs in 4,666 loci. Internal relatedness (IR) from SSRs and SNPs of each seedling was not related to growth traits. When we compared growth traits for each locus, significant differences for growth traits were detected in 96 loci. Subsequently, we extracted RNA from yellow albino seedling and green healthy seedlings of *Abies sachalinensis*. RNA-seq analysis revealed that genes related to flavonoid synthesis expressed in yellow seedling 30 times more than that in green seedling.

研究分野：森林遺伝育種学

キーワード：inbreeding depression RAD-seq genome-wide RNA-seq albino seedling gene ontology conifer

1. 研究開始当初の背景

針葉樹に代表される他殖性の植物で近親交配が生じると、普段はヘテロ型で保有されている有害遺伝子がホモ型になって近交弱勢が顕在化し、近親個体が更新初期に消失すると考えられている。しかし、野外集団において、具体的にどの遺伝子が近交弱勢に関与しているかは未だ不明であり、近交弱勢の遺伝的背景の解明には至っていない。本研究では、エゾマツの天然個体から採取した実生個体群を制御環境下で育成することで近交弱勢を顕在化させ、近縁種であるヨーロッパトウヒのゲノム配列を利用したアノテーション解析を行い、近交弱勢に関与する遺伝子の特定を目指した。

2. 研究の目的

針葉樹では、ホモ型となった実生が負の自然選択を受けることが示唆されているが、どの遺伝子が選択に関与しているかは不明であった。巨大なゲノムサイズのため解析が困難であった針葉樹であるが、近年、次世代シーケンサーが普及し、これまで不可能だった全ゲノムを対象とした解析が可能となった。そして、エゾマツの近縁種ヨーロッパトウヒでは、針葉樹初の全ゲノム配列の概要が公開された (Nystedt et al. 2013 Nature)。近交弱勢メカニズムを明らかにするには、まずは関連遺伝子の特定が必須である。そこで、実生を制御環境下で育成して近交弱勢を顕在化させ、関連する遺伝子を特定することを着想した。さらに、候補遺伝子が存在する領域をヨーロッパトウヒのゲノム情報と照合することで、近交弱勢に関係する遺伝子を推定できると考えた。

本申請課題では、エゾマツにおいて近交弱勢を引き起こしている遺伝子を特定することを目指した。近交弱勢がみられたエゾマツ野外集団から得た母樹別種子を用いて、制御環境下で実生集団を育成する。成長形質を指標としたゲノムワイド SNP (一塩基多型) 解析を行い、関連する遺伝子座を選抜し、ヘテロ接合度と表現型の関連を明らかにする。さらに、候補遺伝子を近縁種のゲノム情報と照合し、近交弱勢に関与する可能性のある遺伝子の候補をリスト化する。また、人工交配で自殖させたトドマツ実生を用いて色素異常個体の遺伝子発現解析と近交系実生と他殖実生の成長解析を行った。

3. 研究の方法

(1) 倒木上に成立したエゾマツ実生の SSR 遺伝子型と生存期間の関係

北海道富良野市の岩魚沢保存林内の倒木上に成立したエゾマツ実生の年齢を調べるとともに、11 の核 SSR マーカーで遺伝子型を特定し、ヘテロ型の割合と年齢の関係を調べるとともに、個

体のラベルをつけて追跡調査を行った。

(2) 制御環境下で育成したエゾマツ母樹別実生の遺伝子型と表現型の関係解明

同じ岩魚沢保存林に分布する成木から個別別に種子を採取し、制御環境下 (灌水施設付きビニールハウス内) のコンテナで実生を育成した。葉から DNA を採取して SSR と RAD-seq で遺伝子型を特定するとともに、実生の生育について 1 成長期、2 成長期目の樹高、2 成長期経過後の乾燥重量を求めた。

(3) 遺伝子型間で成長形質の異なる SNP の探索

育成した実生個体のうち、2 家系 92 個体および母樹 2 個体を加えた、計 94 個体のゲノムワイド変異を ddRAD-seq 法によって検出した。得られた SNPs から内的近縁度 (IR) を算出した。また、遺伝子型によって成長形質 (乾燥重量、地下部乾燥重量等) に差がある SNPs 領域を Kruskal-Wallis 検定から抽出した。統計的有意性 ($p < 0.01$) が示された SNPs が位置するリファレンス配列 (約 350bp) を対象に BLAST 検索を行い、既知の遺伝子が近傍に位置するか検討した。

(4) トドマツの色素異常個体の遺伝子発現解析

トドマツの自殖家系で、半アルビノの黄色の実生と健全な緑色の実生について、RNA-seq による遺伝子発現解析を行った。健全個体で数リード以下の発現レベルに対して黄色個体での発現が 30 倍以上の遺伝子セットについて、トドマツの遺伝子データベース TodoFirGene (Ueno et al. 2018) で機能解析を行った。



図 1. 交配によるトドマツ自殖家系の作出

(5) トドマツの近親交配個体の表現型解析

苗畑で自殖家系と他殖家系をブロック植栽し、その成長比較を行った。マイクロサテライトマーカーで自殖が行われているかどうかを確認したのち、地上部と地下部の乾燥重量を求めた。

4. 研究成果

(1) 倒木上に成立したエゾマツ実生の SSR 遺伝子型と生存期間の関係

SSR 解析の結果、ヘテロ型の割合が高い実生ほど、年齢が高いことが判明した。また、倒木上の実生にラベルを付けて追跡調査した結果、ヘテロ型の割合が高い実生の方が長い期間生存していた。これは近親交配によってホモ型の割合が高くなると初期に近交弱勢によって死亡している可能性が高いことを示唆する。本結果は、Open J For Res 誌に掲載された。

(2) 制御環境下で育成したエゾマツ母樹別実生の遺伝子型と表現型の関係解明

同じ岩魚沢保存林から母樹別に種子を取り、制御環境であるビニール温室内で発芽させ、実生を育成した。IW1 と IW3 を母樹とする実生を対象に、親の RAD-seq データの 7644 コンティグをアセンブルした。親データをリファレンスとして、IW1 と IW3 の実生をマッピングして x10 のカバレッジで SNP コールした結果、4,666 遺伝子座上に 24,276 SNPs が得られた。内的近縁度 (IR) を算出した結果、ほとんどの個体で IR は 0 以下であることが分かった。この結果は、7SSR 遺伝子座の結果と一致した。IR が比較的高い 3 個体は全て 2 年目樹高が 40cm と低い傾向であったが、IR が低くても樹高の低いものも多くあり、IR と樹高に有意な相関性は見られなかった。

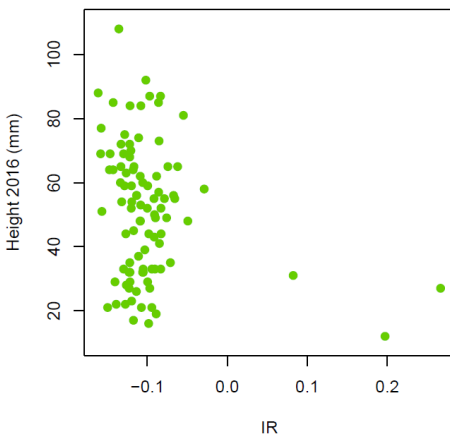


図 2. 内的近縁度 (IR) と 2016 年の樹高の関係

(3) ホモ型とヘテロ型で異なる SNP を含む塩基配列のアノテーション解析

SNP (各 locus1 つ) ごとに遺伝子型 (AA, Aa, aa) と全乾重量の関係についてクラスカル・ウォリス検定を行い、 $p < 0.01$ 以下の SNPs を検出した。ゲノムワイドに SNP 解析をした結果、96 遺伝子座の 133 SNPs で遺伝子型によって有意に異なる結果となった。このうち、14 遺伝子座については、ヨーロッパトウヒの転写領域と相同的な配列が含まれており、機能的遺伝子の近傍にあることが示唆された。

(4) トドマツの色素異常個体の遺伝子発現解析

トドマツの自殖家系において、健全個体でリード以下の発現レベルに対して黄色個体での発現が 30 倍以上の遺伝子セットの中に、フラボノイド合成系の遺伝子が中立で期待される以上の頻度で出現していることが示唆された。

(5) トドマツの近親交配個体の表現型解析

トドマツ自殖系統の種子を用いた実生栽培実験では、オープン交配のものより自殖系統の実生の方が地下部 (根の乾重量や側根の数) の成長が低下していることが明らかとなった。トドマツ実生の近交弱勢の観察には、今後地下部に注目すべきであることが示唆された。

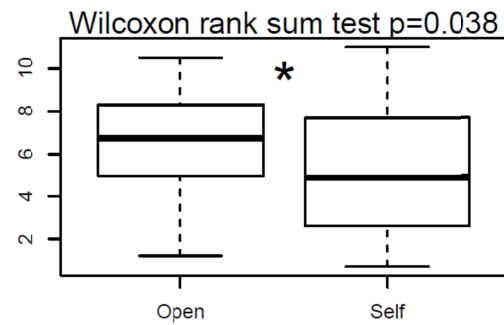


図 3. 地下部重量の自然交配と自殖交配の比較

5. 主な発表論文等

(雑誌論文) (計 3 件)

軽込 勉・久本洋子・米道 学・山田利博・後藤 晋・房総丘陵のヒメコマツにおける集団サイズが近親交配を通じて実生苗サイズとマツ材線虫病抵抗性に及ぼす影響・森林遺伝育種 (受理)

磯辺山河・逢沢峰昭・久本洋子・軽込 勉・齋藤 央嗣・中山ちさ・遠藤良太・後藤 晋・大久保達弘 (2016) 地域絶滅の危惧される関東地方のヒメコマツの遺伝的多様性と交配様式. 日本森林学会誌 98:65-73

Okada M, Kitamura K, Lian C, Goto S (2015) The Effects of Multilocus Heterozygosity on the Longevity of Seedlings Established on Fallen Logs in *Picea jezoensis* and *Abies sachalinensis*. Open Journal of Forestry 5: 422-430

(学会発表) (計 1 件)

中西敦史・岡田桃子・石塚航・北村系子・後藤 晋・エゾマツ集団における空間遺伝構造と遺伝子散布. 第 127 回日本森林学会大会, 2016 年 3 月 29 日

〔その他〕

知念雅輝「トドマツ実生における近交弱勢の検証」玉川大学農学部卒業研究論文(平成 29 年度)pp20

中山みなみ「エゾマツ生育 2 年目における近交弱勢の顕在化」玉川大学農学部卒業研究論文(平成 28 年度)pp21

高橋尚理「エゾマツ生育 1 年目における近交弱勢の顕在化」玉川大学農学部卒業研究論文(平成 27 年度)pp27

大恵真白「エゾマツにおける発芽不良原因解明」玉川大学農学部卒業研究論文(平成 27 年度)pp27

6. 研究組織

(1)研究代表者

後藤 晋(GOTO Susumu)
東京大学・大学院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

三村真紀子(MIMURA Makiko)
玉川大学・農学部・准教授
研究者番号:60451689