

令和 4 年 6 月 24 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K05744

研究課題名(和文) 針葉樹種子の胚乳を用いた胚致死遺伝子の解析法 - 他家受粉、自然受粉種子への拡張 -

研究課題名(英文) Method for evaluating embryonic lethal gene using megagametophyte of conifer seeds: Method for applicable to outcross or open pollinate seeds

研究代表者

向井 譲 (Mukai, Yuzuru)

岐阜大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：80283349

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：SSRマーカーとMIG-seqで検出したSNP座とによってスギの連鎖地図を作成し、分離比をゲノムスキャンした。その結果、両親の自殖家系のいずれでも分離比が偏らず、他家家系の分離比が偏る例(第11連鎖群)、他家家系で分離比が偏った遺伝子座において、両親の自殖家系でも分離比が偏り、二親性近交弱勢と推定される事例(第10連鎖群)を見出すことができた。しかし、連鎖地図のゲノムカバー率が60%程度であったこと、多くの遺伝子座で欠測値があったため、胚致死遺伝子の位置と効果の解析はできなかった。また、自然受粉種子の充実率が低く十分なサンプル数が得られなかったため、自然受粉種子を用いた解析はできなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

他殖及びその両親の自殖種子の胚乳を用いて、両親の連鎖地図を作成し、連鎖地図上の位置が共通で偏った分離比を示す遺伝子座を探索した。有為ではないが、他家および自殖家系に共通する偏った分離比を示す遺伝子座が見つかった。この結果から、二親性近交弱勢に起因する胚致死遺伝子座の存在が示唆された。残念ながら分離データの欠測値が多かったため、研究目標を完全に達成することができなかったが、理論上、胚乳を用いる分析は他家や自然受粉種子にも応用できる有効な配置し遺伝子検出法であると思われる。研究目標の達成には、不完全な分離データの原因となる不完全な胚乳の単離やDNAの収量不足などを改良する必要がある。

研究成果の概要(英文)：Linkage maps for the parent trees used for out-cross and selfing were constructed using the SSRs and the SNPs obtained by MIG-seq analysis and identified the respective linkage group (LG) of consensus map *Cryptomeria japonica*. Using the megagametophytes of the seed, the segregation ratio were scanned along at the loci located on the linkage maps for parent trees.

Although the loci mapped on the LG11 showed significant distorted segregation in the out-cross seeds, significant segregation did not find in the selfing seeds of the both parents. Loci showing marginal significant distortion among the cross- and selfing seeds were found in the LG10, suggesting effect of biparental inbreeding depression.

Because of low genome coverage (60%) of the linkage maps and incomplete haplotype data in many loci, location and effect of embryonic lethal loci could not analyzed. In addition, because of the low seed soundness, effect of embryonic lethal loci in open pollinated seeds could not evaluated.

研究分野：森林遺伝学

キーワード：胚致死遺伝子 連鎖地図 二親性近交弱勢 胚乳 分離比

## 1. 研究開始当初の背景

高度経済成長長期に植林され、伐採されず高齢化した針葉樹人工林の伐採と再造林による若返りが必要となっている。再造林には大量の苗木が必要である。苗木の多くは種子に由来する実生苗であり、採種園に植栽された個体の自然交配によって生産されている。

針葉樹の多くは風媒樹種で、他殖性（自殖だけでなく他殖も行う）であるため、ゲノム内には有害突然変異に起因する致死遺伝子が数多く存在すると言われている。他殖種子よりも自殖種子でシイナ種子（胚や胚乳のない種子）の割合が多くなるのは、自家受精によって胚致死遺伝子がホモ接合になり、胚致死遺伝子が発現して近交弱勢がおこると推定されている。ゲノム内の胚致死遺伝子の数が多いほど近交弱勢は強く働く。自殖に比べ、胚発生の阻害効果は小さいと考えられるが、母樹と花粉親とが共通の胚致死遺伝子を保有する場合は、他殖であっても胚致死遺伝子がホモ接合となり、近交弱勢が発現する。これは二親性近交弱勢と呼ばれている。

苗木の増産を図るためには、採種園など種子生産の場において近交弱勢が起こりやすい個体間の交雑は避ける必要があり、そのためには、自殖家系だけでなく、他殖家系や自然受粉種子にも適用できる胚致死遺伝子の評価方法を開発する必要がある。

## 2. 研究の目的

申請課題の目的は、針葉樹種子の胚乳を用いて、他家受粉や自然受粉にも拡張できる胚致死遺伝子の効果（胚致死等量）の推定法を提案することであり、具体的には、(1)胚における分離比と胚乳における分離比を、連鎖地図に沿ってゲノムスキャンし比較することで、胚致死遺伝子以外の要因による分離比の偏りが区別できる可能性があること、母樹と花粉親とに共通する胚致死遺伝子によって二親性近交弱勢が生じることを実証する。(2)ゲノム全体をカバーする連鎖地図が作成できた場合には、胚致死遺伝子の位置と効果、及び両者を組み合わせた影響を推定する。

(3)(2)の目的が達成できた場合、自然受粉種子を用いてマーカー遺伝子の分離比の偏りによって花粉プールにおける胚致死遺伝子の頻度を解析できることを実証する。

## 3. 研究の方法

### (1)交配家系の作成

岐阜県林木育種事業地（郡上市白鳥町中津屋）で交配を行なった。スギ抵抗性クローン No.54（清見7号）No.69（上宝2号）No.78（今須3号）No.79（今須5号）の4個体を選び、2018年に4×4の完全ダイアレル交配（2018年）及びNo.79×No.54の他殖と両親の自殖を行った（2019年、2020年）。

### (2)SSR マーカーを用いた交配家系及び自殖家系における分離比の調査

分析およびSSR マーカーの探索

スギSSR マーカー(Moriguchi et al. 2009)から43座を選んで、プライマーを合成した。交配に用いた4個体の葉から抽出したDNAを用いて、PCRを行い、DNAアナライザー(ABI prism 3130)を用いて解析し、最も多くの分離データが得られる交配家系とプライマーとの組み合わせを探索した。

交配家系及び自殖家系における分離比の調査

交配に用いた両親の自殖（2家系）および他殖（1家系）のそれぞれについて48個以上の種子から胚と胚乳とをそれぞれ種子ごとに対応付けて分離し、SDS-フェノール法（Okuhara

1970) により DNA を単離した。

多型が検出できた 20 座の遺伝子座で、ABI prism 3130 を用いて胚乳のハプロタイプと胚の遺伝子型を決定した。

## (2)MIG-seq 法を用いた多型遺伝子座の探索、連鎖解析および分離比の調査

### MIG-seq 法による SNP の検出

No.79×No.54 の他殖家系の胚乳 48 個、No79 の自殖家系及び No.54 の自殖家系の胚乳各 48 個、および両親の計 146 サンプルを使用して、MIG-seq 法 (Suyama & Matsuki 2015) による分析を行った。MIG-seq 法によるシーケンスおよび SNP の検出は東北大学大学院 陶山佳久教授と松尾歩学術研究員の御協力により実施した。

胚乳 144 個体から得られた配列データから Stacks ver.1.47 を用いて、SNP の検出を行った。SNP の頻度が全サンプルの 1 割(15 サンプル)以下の遺伝子座を除去し、さらに、両親ともにヘテロ接合となっている遺伝子座と、片親がヘテロ接合かつもう片方の親がホモ接合の遺伝子座(ヘテロ×ホモ)(ホモ×ヘテロ)の 3 種類を解析対象とした。さらに、欠測値の多い遺伝子座を除去した。

### 連鎖解析

連鎖解析はソフトウェア MAPMAKER ver.3.0b(Lander *et al.* 1987, Lincoln *et al.* 1992)を用いて実施した。連鎖判定は、LOD 得点 4.0、地図距離 30cM 未満を閾値とし、連鎖アリと判定された遺伝子座は同一の群にグルーピングを行う。群内の遺伝子座の順序は、3 点法で計算した順序の対数尤度が最も高い組合せを骨格遺伝子座とし、残りの座の挿入位置の対数尤度を計算して、遺伝子座の配列を決定し、連鎖地図を作成した。

## 4 . 研究成果

### (1)SSR マーカーによる分離比の解析

予備解析で多型を示した SSR マーカー 20 座中 18 座において胚乳における分離が見られた。期待分離比 (1:1) から大きく偏った分離比を示した遺伝子座は、第 11 連鎖群の CS1226(29:17)および CS2056(16:30)の 2 座であり、分離比の偏りは  $\chi^2=4.45$  (0.01<P<0.05) および 4.26 (0.01<P<0.05) であった。残り 16 座の中 2 座では有意でないが比較的大きな分離比の偏り (28:17,  $\chi^2=2.69$ , 0.10<P<0.25 および 27:16,  $\chi^2=2.81$ , 0.10<P<0.25) が観察された。一方、期待分離比に近い値の遺伝子座が 3 座あり、残り 8 座の分離比の偏りは  $\chi^2=0.2.09 \sim 2.08$  の範囲であった。

胚乳での分離比が有意に偏っていた CS1226 および CS2056 の 2 座を用いて、胚の分離比を調査した。欠測値の多い CS2056 を解析対象から除外した。CS1226 では、4 つの対立遺伝子が検出され、他殖種子の胚で観察された遺伝子型の分離比は 15:14:12:4 であり、大きく偏っているが、期待分離比(1:1:1:1)からの偏りは、有意ではなかった( $\chi^2=6.644$ , 0.05<P<0.1)。また、花粉親由来の対立遺伝子の分離比は 18:21 であり、期待分離比からの偏りは有意ではなかった( $\chi^2=0.231$ , 0.6<P<0.65)。なお、無花粉スギの交配家系でも第 11 連鎖群で分離比が大きく偏ることが報告されている(田ら 2018)ため、この領域にはスギの複数家系で、他殖種子の分離比の偏りの原因となる共通の遺伝子が存在すると推定される。両親の No.79 および No.54 の自殖種子の胚乳での CS1226 および CS2056 の対立遺伝子の分離比は、22:24( $\chi^2=0.870$ , 0.35<P<0.4)、20:28( $\chi^2=1.333$ , 0.2<P<0.25)および 20:26( $\chi^2=0.783$ , 0.4<P<0.45)、21:27( $\chi^2=0.75$ , 0.4<P<0.45)であり、大きな偏りはなかった。このため、他殖種子の CS1226 および CS2056 の分離比の偏りは二親性近交弱勢では説明できない。

### (2)MIG-seq を用いた SNP の検出、連鎖地図作成

スギの既存の連鎖地図(Moriguchi et al.2009, 2012)に対応付けるため、No.79 と No.54 の2家系で、MIG-seq 分析で得られた SNP 座の分離データと各連鎖群に座乗する 18 座の SSR とを合わせて連鎖解析を行った。

その結果、No.79 の連鎖地図は、既存のスギ連鎖地図と対応付けできた 123 遺伝子座の地図距離の合計の長さは、700.6cM であった。No.54 の連鎖地図では、既存のスギ連鎖地図と対応付けできた 133 遺伝子座の地図距離の合計の長さは、563.1cM であった。スギの連鎖地図は全長、約 1,200cM (Moriguchi et al. 2016)と推定されているため、ゲノムのカバー率は No.79 では約 67%、No.54 では約 53%である。また、遺伝子座間の平均距離は、No.79 では 7.96cM、No.54 では 8.04cM であった。

### (3) 偏った分離比を示す領域

多型が検出できた SNP および SSR 座における分離比の偏りを、他殖及びその両親の自殖家系でそれぞれ 48 個の胚乳を用いて調査した。1:1 の期待分離比からの偏り<sup>2</sup>で評価した。ほとんどの遺伝子座で欠測値があり、欠測値が全くない遺伝子座の数は、他殖 6、No.79 自殖 3、No.54 自殖 15 であった。また、欠測値が 2 個以下の遺伝子座の数は、他殖 52、No.79 自殖 21、No.54 自殖 41 であった。

本研究ではゲノム全域をカバーする連鎖地図を作成し、分離比の偏りをゲノムスキャンして、胚致死遺伝子の位置、数、効果の推定を目指していたが、連鎖地図はゲノムの約 6 割をカバーするにとどまり、分離データに欠測値がある遺伝子座の割合が多かったためこの解析を断念した。代わって、分離比に偏りが見られた染色体領域を 3 家系で比較し、分離比の偏りと胚致死遺伝子との関連を調べた。

第 11 連鎖群では、他殖家系において CS1226、CS2056 の 2 座の SSR の分離比が有意に偏っており、2 座に挟まれた領域の 4 座でも有意な分離比の偏り (Lo16233;28:14,  $\chi^2=4.667, 0.01<P<0.05$ 、Lo15896;32:13,  $\chi^2=8.022, P<0.01$ 、Lo8752;32:14,  $\chi^2=7.043, P<0.01$ 、Lo4881; 31:15,  $\chi^2=5.566, 0.01<P<0.05$ ) がみられた。両親の自殖家系の胚乳を用いた分離比

の解析では、CS1226、CS2056 だけでなく、MIG-seq 解析で得た SNP 座でも、分離比の有意な偏りは検出されなかった(図-1)。したがって、第 11 連鎖群の他殖家系においてみられた分離比の偏りは胚致死遺伝子によるものではないと考えられる。

第 3 連鎖群と第 7 連鎖群においても他殖家系の分離比が有意に偏

る遺伝子座がみられた。第 3 連鎖群では、他殖家系において有意に偏った分離比 (31:16) を示す遺伝子座が存在したが、この遺伝子座における No.79 の自殖家系の分離比は比較的大きいが欠測値も多く、対応する領域に No.54 の遺伝子座がマッピングされていない。また、第 7 連鎖群では、同一の座位にマッピングされた 6 座のうち、2 座では欠測値が少なく、他殖家系の分離比 (30:16,  $\chi^2=4.266, 0.01<P<0.05$ 、及び 31:17,  $\chi^2=4.083, 0.01<P<0.05$ ) は有意に偏った。No.79 の自殖家系では、第 7 連鎖群の中で分離比が有意に偏る遺伝子座があったが、欠測値が多く、他殖家系で分離比が有意に偏った遺伝子座から 30cM 以上離れており、この間に存在する遺伝子座で分離比の偏りがみられない。

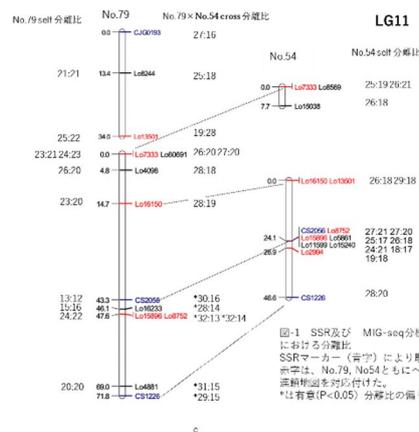


図-1 SSR及び MIG-seq分析で得られたSNP遺伝子座の連鎖地図と各遺伝子座における分離比。SSRマーカー(青字)により既存のスギ連鎖地図の第11連鎖群(LG11)に対応付けた。赤字は、No.79、No.54ともにヘテロヘテロの遺伝子座でNo.79、No.54それぞれの連鎖地図に対応付けた。\*は有意(P<0.05)分離比の偏りを示す。

第 10 連鎖群では、他殖家系において Lo6478 の分離比が 30:18 となり、有意ではなかったが、比較的大きな偏りがみられた ( $\chi^2=3.0$ ,  $0.05 < P < 0.1$ )。No.79 の自殖家系でも、Lo21053 で分離比が 30:17 ( $\chi^2=3.596$ ,  $0.05 < P < 0.1$ ) となり、大きな分離比の偏りがみられた。これらの遺伝子座は、他殖家系において分離比に大きな偏りがみられた Lo6478 の近傍 (地図距離が 6.5cM) に存在する。また No.54 の

自殖家系では、Lo6478、Lo 11446、Lo2402 の 3 座が組換え価が 0 であり、分離比がそれぞれ 29:19 ( $\chi^2=2.083$ ,  $0.15 < P < 0.2$ )、29:17 ( $\chi^2=3.130$ ,  $0.05 < P < 0.1$ ) であり、有意差ではないが、比較的大きな偏りを示した (図-2)。したがって、No.54 でもこの 3 座の付近に胚致死遺伝子が存在しており、No.79 と No.54 の各々の自殖家系が

もつ胚致死遺伝子の影響によって、他殖家系の Lo6478 で分離比が大きく偏ったと考えられる。この第 10 連鎖群でみられた結果から、各々の自殖家系で分離比の偏る遺伝子座が連鎖地図上で近くに存在し、他殖家系の分離比も偏っていたため、本研究で探索目的とした二親性近交弱勢を示す事例であると考えられる。

No.79 と No.54 の自殖家系を比較すると、分離比が有意な偏る遺伝子座の位置や数に違いがある。分離比が偏った遺伝子座が存在する連鎖群は、No.79 の自殖家系では、第 3、第 4、第 5、第 7、第 10 連鎖群の 5 連鎖群、No.54 の自殖家系では、第 4、第 7 連鎖群の 2 連鎖群であった。また、偏った分離比を示す遺伝子座数は、No.79 の自殖家系では 18 座、No.54 の自殖家系では 3 座であった。分離比を調査した遺伝子座に対する割合は、No.79 の自殖家系は 10.7%、No.54 の自殖家系は 1.8%であった。

交配家系によって、胚致死遺伝子の保有数が異なる事例が報告されている (Kanazashi *et al.* 1990, Bodenes *et al.* 2016 など)ため、No79 と No.54 との偏った分離比を示す遺伝子座数の違いが、保有する胚致死遺伝子数の違いに起因する可能性がある。しかし、出現頻度 10% (観察数  $148 \times 0.1 = 15$ ) 以下の SNP を除外したことも関係する可能性がある。分析した胚乳の数は No.79 では、自殖 48+他殖 48 の合計で 96 あるため、致死効果 100% の致死遺伝子と完全に連鎖する SNP でも、胚乳での期待数は 32 となり、15 以下になることはない。しかし、No.54 では自殖家系のみ 48 個であるため、同様の胚致死遺伝子と完全連鎖する SNP の胚乳での期待数は 16 個となり、致死遺伝子以外の要因によって 1 個でもデータが失われると、除外基準の 15 個になって分析対象から外された可能性がある。

本研究では、SSR マーカーと MIG-seq で検出した SNP 座とによって連鎖地図を作成し、分離比をゲノムスキャンした。その結果、両親の自殖家系のいずれでも分離比が偏らず、他殖家系の分離比が偏る例 (第 11 連鎖群) 他殖家系で分離比が偏った遺伝子座において、両親の自殖家系でも分離比が偏り、二親性近交弱勢と推定される事例 (第 10 連鎖群) を見出すことができ、研究目標(1)は達成された。しかし、連鎖地図のゲノムカバー率が 60%程度であったこと、多くの遺伝子座で欠測値があったため、目標(2)の胚致死遺伝子の位置と効果の解析はできなかった。また、自然受粉種子の充実率が低く十分なサンプル数が得られなかったことに加え、(2)が達成できなかったため、(3)の自然受粉種子を用いた解析はできなかった。

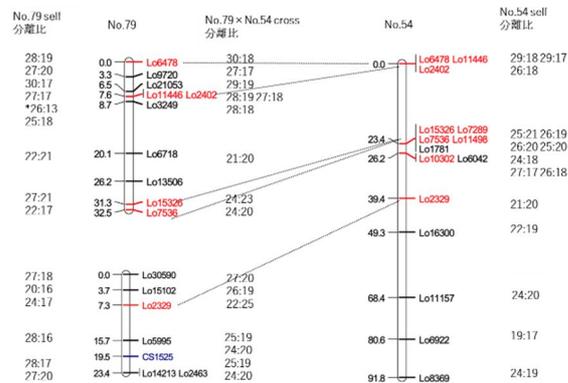


図-2 SSR及び MIG-seq分析で得られたSNP遺伝子座の連鎖地図と各遺伝子座における分離比。SSRマーカー(青字)により既存の連鎖地図の第10連鎖群(LG10)に対応付けた。赤字は、No.79, No54ともにヘテロ×ヘテロの遺伝子座でNo.79, No54それぞれの連鎖地図を対応付けた。\*は有意(P<0.05)分離比の偏りを示す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 梶井敦仁、松尾歩、陶山佳久、向井 譲
2. 発表標題 スギの胚乳を用いた胚致死遺伝子の検出
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 梶井敦仁・森口喜成・向井 譲
2. 発表標題 胚乳を用いたスギの胚致死遺伝子の検出 自殖家系と他殖家系の比較
3. 学会等名 第131回日本森林学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 梶井敦仁、加藤敬介、伊藤愛、桐原奏子、森口喜成、戸塚聡子、向井 譲
2. 発表標題 胚乳を用いたスギの胚致死遺伝子の検出
3. 学会等名 第130回日本森林学会大会
4. 発表年 2019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
---------	---------